



Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Institut Cochin, U1016

Complexité des maladies mitochondriales : à partir de deux exemples

Par Mylène Gilleron

Thèse de doctorat

Dirigée par le Dr Anne Lombès et le Dr Claude Jardel

Présentée et soutenue publiquement le 30 Juin 2014

Devant un jury composé de :

Pr Martin CATALA

Pr Jean-Pierre MAZAT

Dr Bernard FROMENTY

Dr Francis HARAUX

Dr Frédéric BOUILLAUD

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Remerciements

A mes directrices de thèse, Mesdames le Docteur Anne Lombès et le Docteur Claude Jardel :

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans vos laboratoires et de m'avoir permis de découvrir le vaste monde de la mitochondrie. J'ai pu bénéficier de vos conseils avisés. J'espère que ce travail aura su vous satisfaire.

A mon président de thèse, Monsieur le Pr Martin Catala :

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Soyez assuré de toute ma reconnaissance et veuillez trouver dans ce travail l'expression de toute ma considération.

A mes juges, Mr le Pr Jean-Pierre Mazat, Mr le Dr Bernard Fromenty, Mr le Dr Francis Haraux et Mr le Dr Frédéric Bouillaud :

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et d'avoir consacré du temps à l'évaluation de mon travail. Soyez assurés également de toute ma reconnaissance.

A toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail et plus particulièrement...

Je remercie le Professeur Dominique Bonnefont-Rousselot pour m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je remercie le Docteur Frédéric Bouillaud pour m'avoir accueillie dans son laboratoire à mi-parcours de ma thèse.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe « mito » et de l'U1016 de la faculté de médecine de Cochin. Je remercie tout d'abord plus particulièrement ma british préférée Caroline L'hermitte-Stead pour son aide précieuse dans la réalisation de ce travail, son écoute dans les moments difficiles et pour nos nombreux petits délires que je préfère passer ici sous silence...Merci également à Pauline Esteves pour son aide, ses conseils scientifiques (ou autres...sans commentaire...) et sa bonne humeur quotidienne. Je remercie le Docteur Karine Auré pour avoir contribué à l'accroissement de mes connaissances scientifiques ...et

...musicales ! Je tiens à remercier les anciennes « mito », Isabelle Nelson, Patricia Oliviero, Virginie Agier et Anne-Laure Bulteau pour leur sympathique accueil à mon arrivée et leurs précieux conseils à mes débuts dans le monde de la mitochondrie. Je remercie un nouveau « mito », Pierre Lesimple, pour son aide à la fin de ma thèse (et entre autres pour son aide informatique, là encore sans commentaires...non non je n'ai pas virucé plusieurs ordinateurs...). Je remercie également les autres nouveaux « mito » : Hala Bounihi, Abbas Abou Hamdan et Baptiste Murgues pour avoir contribué à la bonne humeur de notre petit bureau. Je remercie le Docteur Clotilde Alves-Guerra pour son soutien et nos petites discussions de fin de journée. Je remercie Céline Ransy pour ses précieux conseils techniques. Je remercie enfin le reste de l'équipe : le Docteur Carina Prip-Buus, Eliska Vavrova, Véronique Lenoir, Catherine Esnous, Guillaume Philouze et le Pr Daniel Ricquier.

J'adresse mes sincères remerciements à Isabelle Lemièrre et Sandrine Fillaut du centre de génétique du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière/Charles Foix pour leur aide technique.

Je remercie le Dr Anne-Sophie Lèbre et Zahra Assouline du laboratoire de génétique de l'hôpital Necker pour leurs conseils techniques sur le BN-PAGE.

Je tiens à remercier le Docteur Maya Tchikviladzé pour notre collaboration sur la partie « POLG ».

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à mes collègues du service de Biochimie Métabolique du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière/Charles Foix pour leur soutien au cours de ces longues années : Le Dr Denis Monneret, le Dr Alix Debecdelièvre, le Dr Sylvie Dever, le Dr Nabil Koujah, le Dr Pascale Richard, le Dr Véronique Fressart, le Dr Foudil Lamari, Isabelle Lemièrre, Gaelle Lemagny, Imen Benyounes, Tuyet Pham et bien d'autres...

Enfin je remercie :

Mes parents, parce que je sais tout ce que je vous dois...

Ma famille, Véronique, Eric, Louis, Victor, Caroline, Sandrine pour votre présence à mes côtés et votre affection.

Tous mes amis bordelais, lillois d'origine ou d'adoption (comme moi) et parisiens parce que sans vous, toutes ces années d'étude auraient été bien tristes !

Sommaire

I.	Introduction.....	23
A.	La mitochondrie.....	23
1.	Origine de la mitochondrie	23
2.	Structure mitochondriale.....	25
3.	Dynamique mitochondriale.....	27
4.	Fonctions mitochondriales	33
a)	Métabolisme énergétique et synthèse d'ATP	33
b)	Mort cellulaire	37
c)	Homéostasie calcique	39
5.	Mitochondrie et stress oxydant	41
a)	Les différentes ERO et ERN.....	41
b)	Production des ERO et des ERN	42
c)	Les défenses anti-oxydantes	43
B.	Génétique mitochondriale.....	45
1.	ADN mitochondrial	45
a)	Structure.....	45
b)	Réplication.....	49
c)	Transcription.....	50
d)	Traduction et code génétique.....	51
e)	Protéines codées par l'ADN mitochondrial	53
f)	Hérédité et hétéroplasmie	53
g)	Haplogroupes et haplotypes.....	55
2.	ADN nucléaire	55
a)	Protéines synthétisées	55
b)	Import des protéines à la mitochondrie	57
C.	Pathologies mitochondriales.....	59
1.	Génétique	59
a)	ADN mitochondrial (ADNmt).....	59
b)	ADN nucléaire	61
2.	Clinique.....	63

3. Pathologies secondaires à une atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale	66
4. Diagnostic	69
5. Traitement	72
6. Conseil génétique.....	74
II. Projet de thèse et objectif.....	77
III. Etude des déficits du complexe III.....	79
A. Introduction	79
1. Le complexe III (ubiquinol cytochrome <i>c</i> oxydoréductase)	79
a) Composition.....	79
b) Structure.....	79
c) Assemblage.....	83
(1) Description	83
(2) Facteurs d'assemblage du complexe bc1	83
d) Implication du complexe III dans les supercomplexes respiratoires	87
e) Fonction du complexe III.....	89
2. Déficits humains en complexe III	91
a) Etudes antérieures à la découverte d'une cause génétique	91
b) Causes génétiques identifiées	91
(1) MT-CYB	91
(2) UQCRB	93
(3) UQCRQ.....	93
(4) UQCRC2.....	93
(5) BCS1L.....	95
(6) TTC19 (Tetratricopeptide repeat domain 19)	96
(7) LYRM7	96
B. Résultats.....	99
1. Recrutement des patients	99
a) Déficits en complexe III dépistés sur biopsie musculaire et/ou hépatique	99
b) Présence d'un déficit enzymatique dans les fibroblastes cutanés.....	101
c) Tableau clinique des patients de l'étude.....	101
d) Bilan de la cohorte	107
2. Analyse spectrophotométrique des fibroblastes des patients.....	109

a) Vérification de l'influence du changement de protocole de dosage.....	109
b) Classification du déficit exprimé dans les fibroblastes.....	109
c) Lien entre les données cliniques et biologiques et l'activité résiduelle du complexe III dans les fibroblastes.....	113
3. Impact sur la respiration des déficits en complexe III	113
a) Impact sur la respiration basale	115
b) Impact sur la respiration maximale.....	115
c) Impact sur les autres paramètres respiratoires	117
4. Impact sur le potentiel membranaire mitochondrial	119
a) Validation du protocole d'analyse du potentiel	119
b) Séparation des patients en sous-groupes.....	121
c) Résultats.....	121
5. Impact sur le métabolisme des espèces réactives de l'oxygène.....	123
a) Production d'ion superoxyde	125
(1) Validation du protocole d'analyse	125
(2) Analyse des cellules déficitaires	127
b) Moyens de défense contre le stress oxydant.....	129
c) Présence de dommages oxydatifs sur les protéines cellulaires.....	131
(1) Quantification des nitrotyrosines	131
(2) Quantification des groupements carbonyles	133
6. Impact sur le temps de doublement et la survie cellulaire	135
a) Temps de doublement cellulaire.....	135
b) Survie cellulaire après stress métabolique et oxydatif.....	137
c) Sensibilité à l'apoptose	139
(1) Validation du protocole d'analyse	141
(2) Analyse des cellules déficitaires	141
7. Recherche de la cause génétique des déficits	143
a) Composition du complexe III	143
b) Etude par électrophorèse en conditions natives.....	145
c) Identification de gènes candidats par séquençage direct	147
(1) CYC1 (NM-001916.3)	149
(2) UQCRFS1 (NM-006003.2).....	151
(3) MT-CYB (NC-012920.1).....	151
(4) UQCRB (NM-006294.3)	151

(5) UQCRQ (NM-014402.4)	153
(6) BCS1L (NM-004328.4)	153
d) Séquençage de l'exome	153
(1) Identification de mutations candidates.....	153
(2) Validation des mutations par complémentation fonctionnelle.....	155
C. Discussion.....	158
1. Les déficits en complexe III en général	158
a) Discordance des déficits exprimés dans les différents tissus.....	158
b) Retentissement sur les flux respiratoires et le potentiel de membrane	160
c) Stress oxydant.....	160
d) Survie cellulaire au stress	161
e) Présentations cliniques des déficits en complexe III	162
2. Les déficits en complexe III en fonction de leur cause génétique	163
a) Anomalies structurales du complexe III	163
b) Identifications génétiques	164
D. Conclusions-Perspectives	165
IV. Etude de la répartition tissulaire	169
A. Introduction	169
B. Résultats.....	171
C. Discussion.....	175
V. Etude des conséquences des mutations de l'ADN polymérase γ	177
A. Introduction	177
1. L'ADN polymérase γ	177
a) Structure.....	177
b) Fidélité de la réplication de l'ADN mitochondrial	179
2. Syndromes cliniques associés à des mutations de <i>POLG</i>	181
a) Signes cliniques généraux.....	181
b) Anomalies moléculaires et biochimiques	182
c) Syndromes cliniques.....	183
(1) Syndrome d'Alpers-Huttenlocher	183
(2) Syndrome Myocérébrohépatopathie pédiatrique (MCHS)	183
(3) Syndrome épilepsie myoclonique, myopathie et ataxie sensorielle	
(MEMSA).....	184

(4) Neuropathie ataxiante.....	184
(5) Ophtalmoplégie externe progressive : Syndrome PEO ou PEO+ (en cas d'atteinte multiviscérale).....	184
(6) Autres présentations cliniques.....	185
3. Mutations de <i>POLG</i>	185
a) Base de données des mutations de <i>POLG</i>	185
b) Caractéristiques générales des mutations de <i>POLG</i>	187
c) Démonstration du caractère délétère des mutations de <i>POLG</i>	187
d) Principales mutations de <i>POLG</i>	188
(1) Domaine Polymérase	188
(2) Région intermédiaire.....	189
(3) Domaine exonucléase.....	189
(4) Association de mutations	190
(5) Mutations non-sens	191
4. Mutations de <i>POLG2</i> et syndromes associés.....	191
5. Traitement	192
B. Résultats.....	193
1. Recrutement des patients et classification	193
2. Mutations de <i>POLG</i>	195
(1) Evaluation du caractère pathogène des mutations	195
(2) Mutations ne touchant qu'un allèle du gène <i>POLG</i>	197
3. Investigations mitochondriales	197
a) Fréquences d'investigation	199
b) Comparaison entre les groupes <i>POLG</i> ^{+/+} et <i>POLG</i> ^{-/-}	199
(1) Concentration de lactate sanguin	199
(2) Histopathologie musculaire.....	199
(3) Analyse de la chaîne respiratoire mitochondriale	201
(4) Recherche de délétions de l'ADN mitochondrial	201
(5) Associations d'investigations mitochondriales	201
c) Population <i>POLG</i> ^{+/-}	203
4. Phénotype des patients	203
a) Imagerie	205
b) Données électroneuromyographiques.....	205
c) Clinique.....	205

(1) Comparaison entre les groupes POLG ^{+/+} et.....	207
POLG ^{-/-}	207
(2) Population POLG ^{+/-}	209
C. Discussion.....	210
VI. Conclusion générale.....	214
VII. Matériel et méthodes	219
A. Etude des déficits du complexe III	219
1. Culture cellulaire et méthodes associées.....	219
a) Culture de fibroblastes.....	219
b) Préparation de culots secs.....	219
c) Cryocongélation.....	219
d) Immortalisation par le gène de la télomérase	220
e) Préparation de fractions enrichies en mitochondries à partir de fibroblastes en culture	220
f) Méthode de dosage des protéines	221
g) Extraction d'ADN.....	221
h) Méthode de dosage des acides nucléiques.....	221
2. Analyses biochimiques	222
a) Mesures spectrophotométriques des activités résiduelles des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sur tissus ou fibroblastes	222
(1) Préparation de culots secs en vue des dosages spectrophotométriques	222
(2) Préparation d'homogénats tissulaires post-nucléaires en vue des dosages spectrophotométriques	223
(3) Mesure des activités de la chaîne respiratoire et de la citrate synthase	223
3. Méthodes électrophorétiques	223
a) Méthode électrophorétique en conditions dénaturantes	223
(1) Tampons et réactifs	225
(2) Préparation des échantillons pour le Western blot.....	225
(3) Electrophorèse.....	225
(4) Transfert	226
(5) Immunorévélation	226
b) Oxyblot	226

c) Méthodes électrophorétiques en conditions natives	227
(1) Tampons et réactifs	227
(2) Préparation des échantillons.....	229
(3) Isolement de la fraction des mitoplastes	229
(4) Isolement des complexes OXPHOS.....	229
(5) Dépôt	231
(6) Migration.....	231
(7) Transfert	231
(8) Saturation	231
(9) Immunorévélation	233
4. Etude moléculaire : séquençage par méthode de Sanger	233
5. Etude cellulaire	239
a) Méthodes polarographiques : mesure de la respiration cellulaire	239
b) Technique du rouge neutre	239
(1) Application à la mesure du temps de doublement cellulaire.....	240
(a) Ensemencement des cellules	240
(b) Marquage des cellules	240
(c) Mesure du temps de doublement.....	241
(2) Application aux tests de survie cellulaire après stress	241
(a) Stress « métabolique ».....	241
(b) Stress pro-apoptotique	241
c) Cytométrie en flux	243
(1) Principe	243
(2) Analyse de la production d'espèces réactives de l'oxygène	244
(3) Analyse du potentiel membranaire.....	245
(a) Préparation des différentes conditions bioénergétiques	245
(b) Perméabilisation des cellules.....	247
(4) Analyse de l'apoptose	247
6. Analyses statistiques	249
B. Etude de la répartition tissulaire	249
C. Etude des mutations de la polymérase γ	251
1. Matériel	251
2. Méthodes.....	251
a) Séquençage du gène <i>POLG</i> (NM-002693.2).....	251

b) Dosage du lactate sanguin ou céphalo-rachidien	253
c) PCR “Long Range” (ADN mitochondrial).....	255
d) Analyse histochimique des biopsies musculaires	257
e) Mesures spectrophotométriques des activités résiduelles des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sur tissus ou fibroblastes	257
3. Analyses statistiques	257
VIII. Bibliographie	258
IX. Annexes.....	280

Abréviations

ADN: Acide DésoxyriboNucléique
ADN mt : ADN mitochondrial
ADP: Adénosine DiPhosphate
AHS : Alpers-Huttenlocher Syndrom
AIF: Apoptose Inducing Factor
AMP: Adénosine MonoPhosphate
ANT: translocateur des nucléotides adényliques
Apaf-1 : Apoptosis protease activating factor 1
ARN: Acide RiboNucléique
ARNm: ARN messenger
ARNr: ARN ribosomal
ARNt: ARN de transfert
ATP: Adénosine TriPhosphate
BCA : Acide bicinchoninique
Bcl-2 : Bcell lymphoma 2
BN-PAGE : Blue Native- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
BSA: Bovin Serum Albumin
Cccp: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine
CM : Cristae Membrane
CoA-SH : Coenzyme A libre
COX: cytochrome *c* oxydase
CPEO : Chronic Progressive External Ophtalmoplegy
CPK : Créatine PhosphoKinase
CSP : Codon Stop Prématuro
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DCPIP: 2,6 dichlorophénol-indophénol
DGUOK : Déoxyguanosine Kinase
DHAP : phosphate de dihydroxyacétone
DMEM: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DNPH : DiNitroPhenylHydrazine
dNTP : mélange des 4 désoxyribonucléotides
Drp: Dynamin related protein
dRP : 5'-Désoxyribose Phosphate
DTNB : DiThioNitroBenzoic acid
EDTA : EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EGTA : EthyleneGlycolTetraacetic Acid
EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein
ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène
ERN: Espèces Réactives de l'Azote
ETF: Electron Transfer Flavoprotein
FADH₂: Flavine Adénine Dinucléotide réduit
FEN : Flap Endonuclease
Fe-S: Fer-Soufre
Fis-1 : Mitochondrial Fission Protein 1
GAP : Glycéraldéhyde 3 phosphate

Gpx : Glutathion Peroxydase
 GRACILE : Growth Retardation Aminoaciduria Cholestasis Iron overload Lactic acidosis and Early death
 GTP: Guanosine-5'-TriPhosphate
 HMG : High Mobility Group
 H₂O₂: peroxyde d'hydrogène
 HRP : HorseRadish Peroxydase
 hrCNE : Clear Native PAGE haute résolution
 HSP : Heavy Strand Promoter
 HSP70 : Heat Shock Protein 70
 IBM : Internal Border Membrane
 IP : iodure de propidium
 IRM: Imagerie par Résonance Magnétique
 ISP : Iron Sulfur Protein
 KCN : Cyanure de potassium
 KO : Knock Out
 KSS: Kearns-Sayre Syndrome
 LCR : Liquide céphalo-rachidien
 LHON : Leber Hereditary Optic Neuropathy
 LP-BER : Long-Patch Base Excision Repair
 LSP : Light Strand Promoter
 LYRM7 : LYR motif containing 7
 MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-time-of-flight mass spectrometry.
 MAPK : Mitogen Activating Protein Kinase
 MCHS : Myocerebrohepatic syndrom
 MELAS: Mitochondrial myopathy, Encephalopathy Lactic Acidosis Stroke-like episodes
 MEMSA : Myoclonic Epilepsy Myopathy Sensorial Ataxy
 MERRF: Myoclonus Epilepsy associated with Ragged-Red Fibers
 MES : 2-(N-Morpholino)EthaneSulfonic acid
 Mfn: Mitofusine
 MIRAS : Recessive Mitochondrial Ataxia Syndrom
 MNGIE: Mitochondrial NeuroGastro-Intestinal Encephalomyopathy
 MPP: Mitochondrial Processing Peptidase
 MRP : Mitochondrial RNA Processing
 MSF : Facteur Stimulant l'importation Mitochondriale
 mtEFTu : mitochondrial elongation factor Tu
 mtEFTs : mitochondrial elongation factor Ts
 mt EFG1 : mitochondrial elongation factor G1
 MTERF1 : Mitochondrial Termination Factor 1
 mtRF1 : mitochondrial Release Factor 1
 mtRRF : mitochondrial Ribosome Recycling Factor
 mtSSB : mitochondrial Single Stranded DNA-Binding
 mtTFA: mitochondrial transcription Factor A
 mtTFB: mitochondrial transcription Factor B
 NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
 NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
 NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
 NARP : Neuropathy, Ataxia and Retinis Pigmentosa
 NAS : Nonsense-associated Alternative Splicing pathway

NfκB : Nuclear factor κB
 NGS : New Generation Sequencing
 NMD : Non sense Mediated Decay
 NOS : Nitric Oxide Synthase
 NRP-1 : Nuclear Respiratory protein 1
 O₂^{•-} : anion superoxyde
 OH[•] : radical hydroxyle
 Omi/HtrA2 : homotrimeric serine protease high-temperature requirement A2
 OPA1: Optic Atrophy 1
 OXPHOS: chaîne des oxydations phosphorylantes
 PALM : PhotoActivated Light Microscopy
 PARL: Presenilin Associated Rhomboid Like
 PARP : Poly ADP Ribose Polymerase
 PBS : Phosphate-Bufferd Saline
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 PDH : Pyruvate Déshydrogénase
 PEO : Progressive External Ophtalmoplegy
 PH : Plekstrine Homology
 POLG : Polymerase Gamma
 POLRMT : ARN polymerase mitochondriale
 PR : Proline Rich
 PVDF : PolyVinylidene DiFluoride
 QMPSF : Quantitative Multiplex PCR of Short Fragment
 RCR : Respiratory Control Ratio
 RITOLS : Ribonucleotide Incorporation Throughout the Lagging Strand
 RRF : Ragged Red Fibers
 RRM2B : Ribonucléotide Reductase M2B
 SAM : Sorting and Assembly Machinery
 SANDO : Sensory Ataxic Neuropathy Dysarthria Ophthalmoparesis
 SCAE : Syndrome d'ataxie spino-cérébelleuse avec épilepsie
 SDH : succinate déshydrogénase
 SDM : Strand-Displacement Mechanism
 SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
 SDS-PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
 SH3 : src-homology-3
 siRNA : ARN interférence
 Smac/DIABLO : Second mitochondrial activator or Direct IAP Binding Protein with Low pI
 SN-BER : Single Nucleotide-Base Excision Repair
 SOD : Superoxyde dismutase
 STIC : Soutien aux Techniques Innovantes et Couteuses
 SVF : Serum de veau foetal
 tBH : tert-ButylHydroperoxide
 TTC19 : Tetratricopeptiderepeatdomain 19
 TEFM : Transcription Elongation Factor of Mitochondria
 TFAM : Transcription Factor A of Mitochondria
 TFB : Transcription Factor B
 TIM : Translocase of Inner Membrane
 TK2 : Thymidine Kinase 2
 TNF : Tumor Necrosis Factor
 TOR : Target Of Rapamycin

TOM : Translocase of Outer Membrane
TYMP : Thymidine Phosphorylase
UHDBT : 5-n-Undecyl-6-Hydroxy-4,7-DioxoBenzoThiazole
UQCRB : Ubiquinol-cytochrome *c* reductase binding protein
VDAC : Voltage Dependent Anion Chanel
WES : Whole Exome Sequencing
XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis

Liste des illustrations

Figures

Figure 1 : Hypothèses alternatives décrivant les origines de la cellule eucaryote.....	p22
Figure 2 : Composition protéique des complexes mitochondriaux.....	p22
Figure 3 : Structure de la mitochondrie	p24
Figure 4 : Image obtenue par tomographie 3D (mitochondrie de cervelet de poussin).....	p24
Figure 5 : Structure et fonction de la mitochondrie	p26
Figure 6 : Complexe moteur/adaptateur mitochondrial.....	p28
Figure 7 : Topologie des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale des mammifères.....	p28
Figure 8 : Régulation de la morphologie mitochondriale par les mécanismes de fusion/fission.....	p30
Figure 9 : Métabolisme du glucose.....	p32
Figure 10 : Chaîne des oxydations phosphorylantes	p34
Figure 11 : Voies mitochondriales de mort cellulaire : nécrose et apoptose	p36
Figure 12 : Nature et relations entre les principaux radicaux libres et espèces réactives de l'azote et de l'oxygène intervenant dans le phénomène de stress oxydatif.....	p40
Figure 13 : ADN mitochondrial humain.....	p46
Figure 14 : Trois modèles de réplication de l'ADN mitochondrial	p48
Figure 15 : Phase d'élongation lors de la traduction procaryotique	p52
Figure 16 : Goulot d'étranglement génétique mitochondrial ou « bottleneck ».....	p54
Figure 17 : Import des protéines à la mitochondrie	p56
Figure 18 : Interaction entre les deux génomes pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale	p60
Figure 19 : Clinique des maladies mitochondriales	p62
Figure 20 : Carte de morbidité de l'ADN mitochondrial humain	p64
Figure 21 : Anomalies histopathologiques musculaires rencontrées dans les maladies mitochondriales	p68
Figure 22 : Algorithme décisionnel pour le diagnostic moléculaire des patients suspectés de maladie mitochondriale	p70

Figure 23 : complexe bc1 de vertébré.....	p80
Figure 24 : Assemblage du complexe bc1 chez la levure.....	p82
Figure 25 : Assemblage du complexe bc1 chez les mammifères	p82
Figure 26 : Quelques exemples de supercomplexes	p86
Figure 27 : Cycle Q	p88
Figure 28 : Mutations pathogènes du gène <i>BCS1L</i>	p94
Figure 29 : Résultats du dosage des activités musculaires du complexe III en spectrophotométrie	p98
Figure 30 : Présence uniquement dans le muscle de la mutation m.15150G>A (p.Trp135X) de <i>MT-CYB</i>	p98
Figure 31 : Activité du complexe IV représentée en fonction du complexe III (Fibroblastes).....	p110
Figure 32 : Signes cliniques et biologiques en fonction de l'activité résiduelle du complexe III dans les fibroblastes.....	p112
Figure 33 : Impact de la sévérité du déficit en complexe III sur la respiration basale des fibroblastes	p114
Figure 34: Impact de la sévérité du déficit en complexe IV sur la respiration basale des fibroblastes	p114
Figure 35 : Impact de la sévérité du déficit en complexe III sur la respiration maximale des fibroblastes	p116
Figure 36 : Impact de la sévérité du déficit en complexe IV sur la respiration maximale des fibroblastes	p116
Figure 37 : Potentiel de membrane dans les cellules contrôles	p118
Figure 38 : Potentiel de membrane interne mitochondriale (glutamate/malate)...	p120
Figure 39 : Potentiel de membrane interne mitochondriale (succinate).....	p122
Figure 40 : Cinétique du MitoSox dans les cellules contrôles	p124
Figure 41 : Comparaison de la production d'ion superoxyde entre fibroblastes déficitaires et contrôles.....	p126
Figure 42 : Production d'ion superoxyde dans les cellules avec un déficit isolé en complexe III	p126
Figure 43 : Production d'ion superoxyde dans les cellules avec un déficit isolé en complexe IV	p128

Figure 44 : production d'espèces réactives de l'oxygène chez les déficits en complexe III + IV	p128
Figure 45 : Expression de la peroxyredoxine 3 (Prdx3) dans les fibroblastes de patients	p130
Figure 46 : Expression de la superoxyde dismutase 2 (SOD2) dans les fibroblastes de patients	p130
Figure 47 : Expression de la nitrotyrosine dans les fibroblastes de patients	p132
Figure 48 : Recherche de groupements carbonyle par la technique d'oxyblot.....	p132
Figure 49 : Temps de doublement des cellules contrôles	p134
Figure 50 : Temps de doublement cellulaire	p134
Figure 51 : Test de survie cellulaire après stress métabolique et oxydatif	p136
Figure 52 : Test de réponse au stress pro-apoptotique	p138
Figure 53 : Proportion de cellules apoptotiques dans les différentes conditions testées.....	p140
Figure 54 : Expression des sous-unités core 2 et ISP du complexe	p142
Figure 55 : Etude de l'assemblage des complexes respiratoires par électrophorèse en conditions natives (BN PAGE)	p144
Figure 56 : Quantification des différents complexes respiratoires par BN PAGE..	p146
Figure 57 : Arbre de la famille mutée sur le gène <i>CYC1</i> , modification de l'acide aminé et conservation phylogénique de la protéine	p150
Figure 58 : Etude du complexe III par immunoblot dans le muscle de patients avec déficit sévère du complexe III.....	p152
Figure 59 : Arbre de la famille mutée sur le gène <i>LYRM7</i> et conservatiophylogénique de la protéine.....	p154
Figure 60 : Modulation des activités mitochondriales par la transfection des cDNA codant pour <i>LYRM7</i> ou <i>MTO1</i>	p156
Figure 61 : Expression des protéines core 2, ISP et <i>LYRM7</i>	p156
Figure 62 : analyse de la répartition des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale en Blue native PAGE	p168
Figure 63 : Exemple de Western Blot après SDS Page (gel 4-20%)	p170
Figure 64 : Répartition des différents complexes selon les tissus	p172
Figure 65 : Structure de la polymérase γ	p176
Figure 66 : Structure de la sous-unité catalytique POLG	p178

Figure 67 : Processus de réparation des erreurs de réplication de l'ADN mitochondrial.....	p180
Figure 68: Mutations connues du gène <i>POLG</i>	p186
Figure 69 : Constitution de la cohorte de l'étude <i>POLG</i>	p194
Figure 70 : Position des mutations sur le gène <i>POLG</i>	p196
Figure 71 : Prévalence des anomalies mitochondriales	p200
Figure 72 : Anomalies histopathologiques musculaires rencontrées chez les patients <i>POLG</i> +/+ et <i>POLG</i> +/-.....	p202
Figure 73 : Exemple de résultat de PCR longue	p202
Figure 74 : Associations d'investigations mitochondriales	p204
Figure 75 : symptômes cliniques au sein de notre cohorte	p206
Figure 76 : Association de signes	p208
Figure 77 : Evolution clinique des patients porteurs de mutations <i>POLG</i> (signes musculaires)	p208
Figure 78 : Evolution clinique des patients porteurs de mutations <i>POLG</i> (signes neurologiques)	p208
Figure 79 : Organigramme décisionnel des pathologies liées à <i>POLG</i> de l'adulte	p212
Figure 80 : Culture de fibroblastes	p218
Figure 81 : Principe de purification des réactions de séquence (Agencourt Cleanseq).....	p236
Figure 82 : OROBOROS Oxygraph-2k	p238
Figure 83 : Exemple de courbe obtenue avec le protocole de polarographie	p238
Figure 84 : représentation schématique d'un cytomètre en flux	p242

Tableaux

Tableau 1 : Mesure du contenu en ADN mitochondrial par cellule et par nucléoïde	p44
Tableau 2 : Principales mutations de l'ADN mitochondrial et pathologies associées	p64
Tableau 3 : Sous-unités du complexe III	p78
Tableau 4 : 29 cas de patients avec déficits en complexe III publiés de 1970 à 1997 sans identification génétique	p90
Tableau 5: Mutations de <i>MT-CYB</i> (hors LHON)	p92
Tableau 6 : Présentation clinique des 15 patients de l'étude	p100
Tableau 7 : Récapitulatif des investigations réalisées pour les 15 patients	p102
Tableau 8 : bilan des déficits respiratoires observés dans les différents tissus des 15 patients de l'étude	p106
Tableau 9 : comparaison des mesures spectrophotométriques de l'activité du complexe III sur fibroblastes par l'ancienne et la nouvelle méthode	p108
Tableau 10 : comparaison des mesures spectrophotométriques de l'activité du complexe III et IV sur fibroblastes	p110
Tableau 11 : Comparaison des données spectrophotométriques tissus/cellules.	p112
Tableau 12 : Mutations pathogènes identifiées	p148
Tableau 13 : Description de la cohorte de l'étude <i>POLG</i>	p194
Tableau 14 : Mutations mises en évidence dans l'étude	p198
Tableau 15 : Résultat des investigations mitochondriales	p200
Tableau 16 : Symptômes cliniques au sein des 3 groupes	p206
Tableau 17: Récapitulatif SDS-Page	p224
Tableau 18 : Anticorps utilisés pour le Blue Native Page	p228
Tableau 19 : Gènes et amorces	p232
Tableau 20 : Programmes d'amplification PCR	p234
Tableau 21 : Programmes de séquençage (<i>BCS1L</i> , <i>UQCRB</i> , <i>UQCRQ</i> et <i>MT-CYB</i>)	p236
Tableau 22: Amorces et conditions de PCR du gène <i>POLG</i>	p250
Tableaux 23 et 24 : Programmes d'amplification du gène <i>POLG</i>	p252

Tableau 25 : Programme de séquençage du gène <i>POLG</i>	p252
Tableau 26 : Amorces utilisées pour la PCR long range.....	p254
Tableau 27 : Programmes PCR Long range	p254

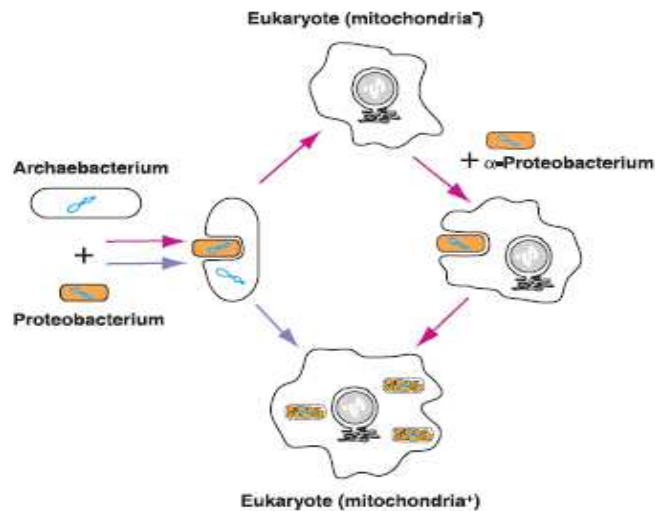


Figure 1 : Hypothèses alternatives décrivant les origines de la cellule eucaryote
M.Gray et al, Science, 1999

Les flèches violettes correspondent à la création simultanée d'un noyau eucaryotique et de la mitochondrie par la fusion d'une archéobactérie avec une protéobactérie.

Les flèches roses correspondent au scénario en 2 étapes avec tout d'abord la formation d'une cellule eucaryote dépourvue de mitochondries puis fusion avec une α -protéobactérie.

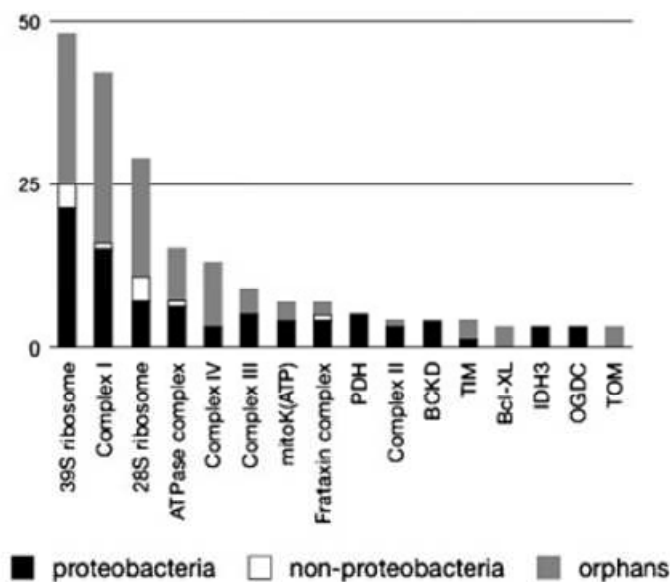


Figure 2 : Composition protéique des complexes mitochondriaux

R.Szklarczyk et al, Proteomics, 2010

Seuls les complexes ayant plus de trois sous-unités sont représentés sur cette figure

MitoKATP : canal potassique mitochondrial ATP-sensible ; PDH : complexe pyruvate déshydrogénase, OGDC : complexe α -céto-glutarate déshydrogénase ; BCKD : α céto-acide décarboxylase/déshydrogénase ; IDH3 : isocitrate déshydrogénase 3

I. Introduction

A. La mitochondrie

1. Origine de la mitochondrie

Le terme eucaryote, d'étymologie grecque, signifie vrai noyau. Les plus anciens fossiles reconnus comme eucaryotes ont seulement deux milliards d'années. Une étape clef de leur évolution a été l'acquisition d'un « passager » bactérien qui est devenu la mitochondrie. L'origine endosymbiotique de la mitochondrie est maintenant largement admise même si ses mécanismes sont encore très discutés {Gray, 1999 ; Zimmer, 2009}.

Des études phylogénétiques fondées sur les protéines codées par le génome mitochondrial ont placé l'ancêtre de la mitochondrie dans la subdivision des α -protéobactéries. Les organismes vivants les plus proches de la mitochondrie appartiennent d'ailleurs à la famille des Rickettsiaceae. Par contre, la nature de l'hôte reste encore débattue : il pourrait s'agir soit d'une archéobactérie dépourvue de noyau soit d'une cellule déjà hautement compartimentée {Szklarczyk R, 2010} (Figure 1).

Différentes hypothèses concernant la cause de cette association ont été évoquées. La première était que, deux milliards d'années auparavant, une augmentation de la pression en oxygène atmosphérique aurait causé l'extinction des formes de vie anaérobies incapables de se protéger de la toxicité de l'oxygène. Dans ce cadre, la diminution locale de la pression en oxygène par la respiration d'une bactérie aérobie pourrait être à l'origine d'une relation endosymbiotique avec un partenaire anaérobie. Toutefois cette hypothèse est aujourd'hui largement controversée, la pression atmosphérique en oxygène ayant, semble-t-il, augmenté bien après l'association endosymbiotique {Andersson, 2003}. Une seconde hypothèse serait une symbiose entre une bactérie productrice de H_2 et de CO_2 et une archéobactérie méthanogénique. Les deux se seraient croisées dans une atmosphère anaérobie riche en H_2 géologique puis pour une raison inconnue, la paire aurait été éloignée de la source de H_2 , l'hôte devenant alors strictement dépendant du symbiote {Martin, 1998}. De nombreuses autres hypothèses sont également évoquées et les mécanismes à l'origine de la symbiose restent encore très vagues.

Le protéome mitochondrial moderne est le résultat de processus d'expansion et de réduction. Il comprend environ 1500 protéines. Celles-ci sont presque toutes codées par des

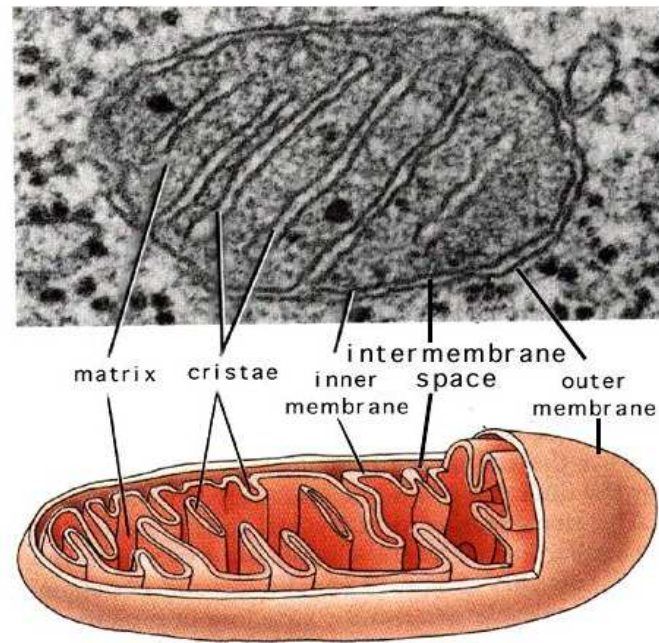


Figure 3 : Structure de la mitochondrie
<http://www.origin-of-mitochondria.net>

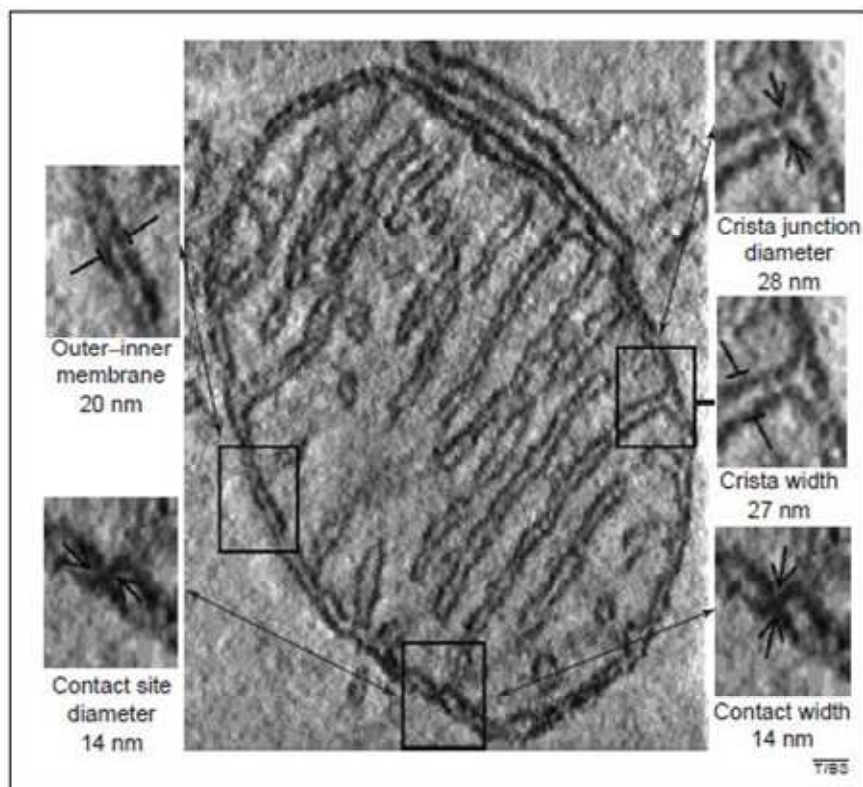


Figure 4 : Image obtenue par tomographie 3D
 (mitochondrie de cervelet de poussin)
T.G.Frey et al, TIBS25, 2000

gènes nucléaires puisque l'ADN mitochondrial ne porte que les gènes de 13 protéines. Les gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales peuvent provenir de l'ancêtre procaryote des mitochondries ou de l'ancêtre eucaryote de la cellule hôte. Ils peuvent aussi être apparus après la symbiose. Selon Szklarczyk et al, la composition protéique des complexes mitochondriaux montre essentiellement une origine α -protéobactérienne (Figure 2) {Szklarczyk R, 2010}.

2. Structure mitochondriale

Le terme « mitochondrie » est d'étymologie grecque, « mitos » signifiant « filament » et « chondros » signifiant « grain » ; cet organite de 1 μm de diamètre environ peut en effet présenter des formes très hétérogènes, plus ou moins allongées. Il est délimité par deux membranes, externe et interne, enfermant une matrice dense qui contient des enzymes du métabolisme intermédiaire, de multiples copies d'ADN mitochondrial et des ARN. L'espace situé entre la membrane interne et la membrane externe est appelé espace intermembranaire (Figure 3).

L'étude de la structure de la mitochondrie a débuté dans les années 50 grâce à la microscopie électronique. Sjöstrand et Palade mettent alors en évidence que la mitochondrie ne possède pas qu'un seul système membranaire {Sjostrand, 1953}. Pour Sjöstrand, la membrane interne forme des cloisons divisant la matrice en compartiments. Pour Palade, la membrane interne ne forme pas des cloisons mais simplement des replis se projetant dans la matrice. C'est ce modèle appelé le « baffle model » qui sera retenu par la suite. La membrane interne est alors constituée de deux régions distinctes : les zones de membrane interne « frontière » (IBM, internal border membrane) et les zones en crête (CM, cristae membrane). Les crêtes se présentent sous différentes formes, tubulaires, sacculaires, laminaires et triangulaires qui peuvent coexister dans la même mitochondrie {Zick, 2009 ; Frey, 2000}.

En 1966, Daems et Wisse identifient par analyse en microscopie électronique à transmission des structures tubulaires reliant les crêtes à la membrane interne qu'ils appellent « pediculi cristae » {Daems, 1966}. Ceci sera confirmé bien plus tard par Mannella et ses collègues par des techniques tomographiques. Ces structures sont alors appelées « jonctions de crêtes » (Figure 4) {Mannella, 1997}. On les trouve dans les mitochondries de nombreux organismes et tissus. Ces mêmes études tomographiques ont montré que les crêtes pouvaient ne pas être reliées à des membranes internes frontières mais constituer des sacs isolés à l'intérieur de la matrice.

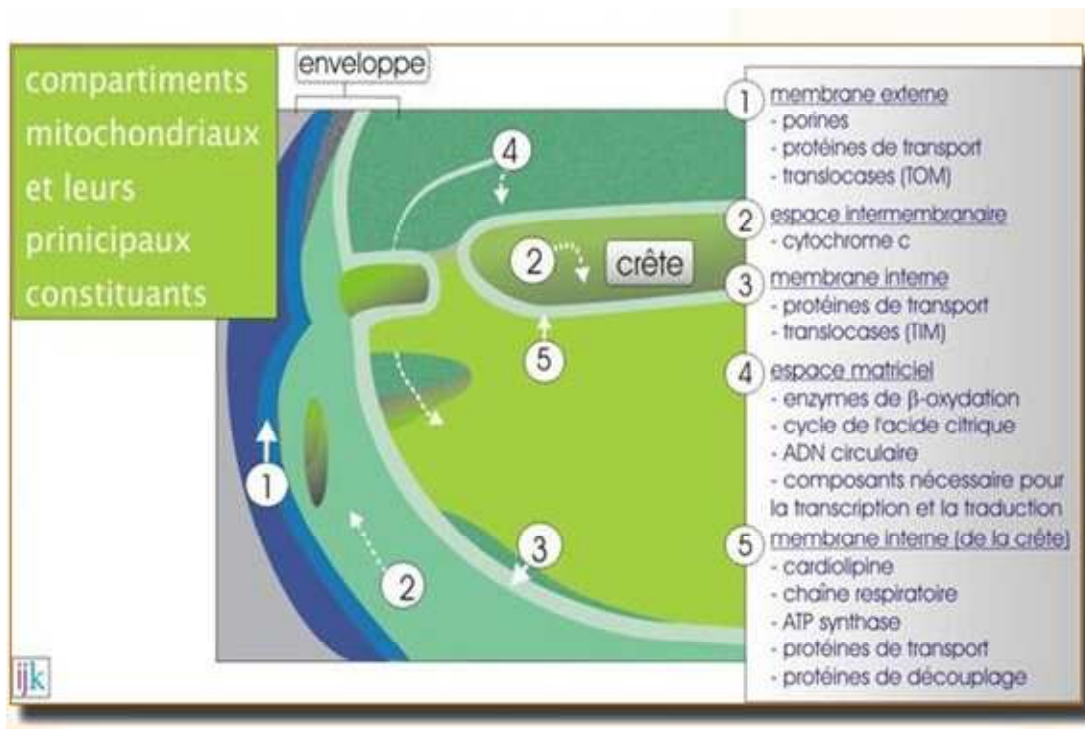


Figure 5 : structure et fonction de la mitochondrie
www.ulysses.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer

Vers la fin des années 60, Hackenbrock montre également que la morphologie des crêtes mitochondriales dépend de l'état respiratoire de la mitochondrie. En excès d'ATP, les crêtes sont gonflées alors qu'en cas de défaut d'ATP, leur volume est considérablement diminué {Hackenbrock, 1968}.

Le mécanisme de formation des crêtes reste encore inconnu mais plusieurs hypothèses ont été émises : simples invaginations de la membrane interne, formation de pré-jonctions se développant par le passage de protéines et de lipides, fusion de vésicules internes ou encore restes de fusions précédentes ...

Enfin, la localisation d'un certain nombre de protéines de la membrane interne a été étudiée chez la levure de boulanger par utilisation de la microscopie à fluorescence. Cette approche a permis de montrer que les composés intervenant dans la chaîne des oxydations phosphorylantes sont plutôt situés dans les crêtes (zone CM) alors que les translocases se trouvent plutôt dans la membrane interne frontière (zone IBM) {Wurm, 2006}. Une étude systématique a par la suite montré que l'on retrouve en zone CM les protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative, la biogénèse des centres Fer-Soufre, la synthèse protéique et le transport des protéines codées par l'ADN mitochondrial (complexe OXA). La zone IBM contient les protéines impliquées dans les processus de fusion et le transport des protéines codées par l'ADN génomique (Complexes TIM23 et TIM22) (Figure 5) {Vogel, 2006}.

3. Dynamique mitochondriale

Les mitochondries ont une morphologie très variable entre tissus mais aussi dans une même cellule au cours du temps. Dans les cellules en culture, elles sont le plus souvent organisées en réseau. La modulation de la forme des mitochondries est appelée dynamique mitochondriale. Elle comprend trois processus différents.

Le premier est le remodelage de l'ultrastructure mitochondriale, en particulier en fonction de l'état respiratoire comme nous avons pu le voir dans le paragraphe précédent pour les crêtes. Des mesures en microscopie électronique et anisotropie de fluorescence sur mitochondries de foie de rat ont montré que durant le transport d'électrons induit par l'ajout d'un substrat tel que le succinate, la mitochondrie prend une conformation orthodoxe et de ce fait la diffusion d'un marqueur fluorescent n'est que très peu entravée. Par contre, lors de la stimulation de synthèse d'ATP par ajout d'ADP, la matrice devient plus condensée freinant la diffusion du marqueur. Enfin, quand le transport des électrons est bloqué par de l'antimycine, la matrice se condense encore plus {Kuzmich, 2011 ; Scalettar, 1991}.

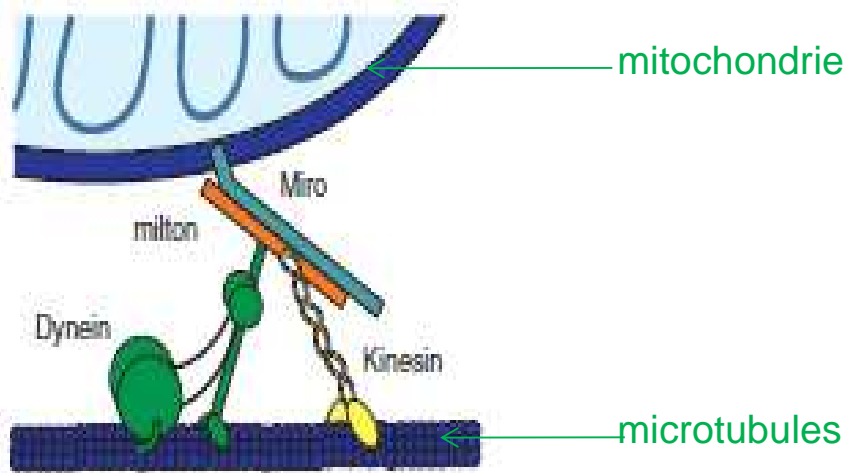


Figure 6 : Complexe moteur/adaptateur mitochondrial
T.L.Schwarz, Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013

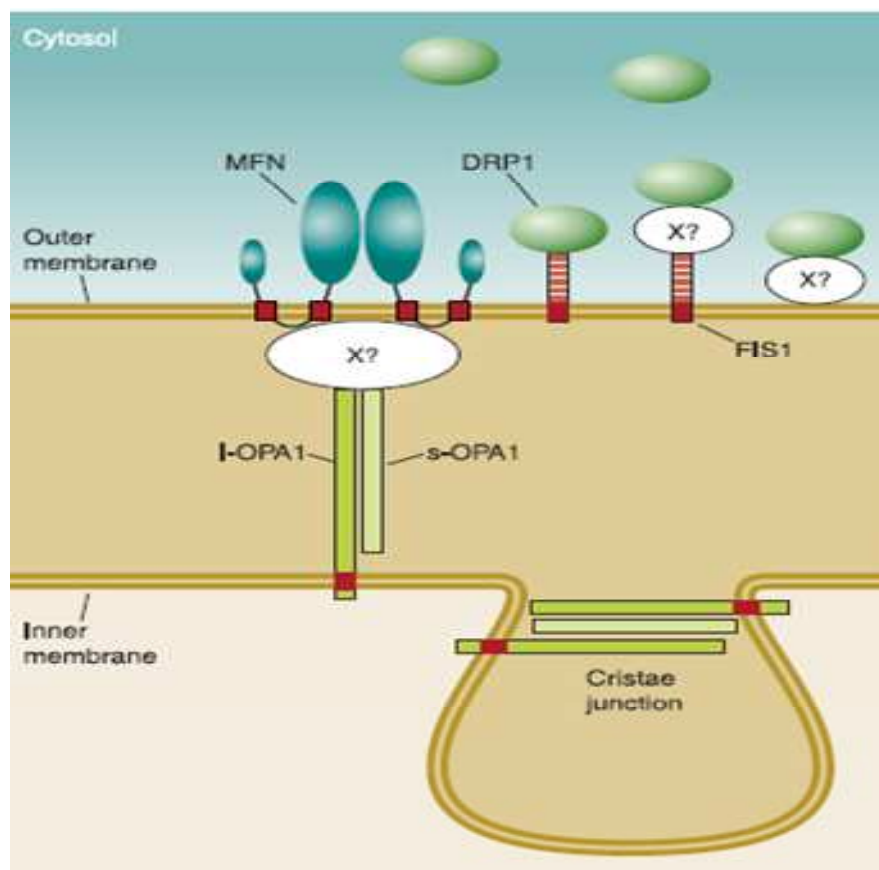


Figure 7 : Topologie des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale des mammifères

M.Liesa, Physiol Rev, 2009

MFN : mitofusines, DRP1 : Dynamin-related Protein 1, Fis-1 : Mitochondrial Fission Protein1, OPA1 : Optic Atrophy 1

Le deuxième processus est la mobilité des mitochondries individuelles à l'échelle subcellulaire. Ces mouvements mitochondriaux permettent l'apport direct en ATP aux processus biologiques le nécessitant. Les neurones ont été très largement utilisés pour étudier ces mouvements. La mobilité des mitochondries est en effet extrêmement importante pour ces cellules très longues dont le corps cellulaire est situé parfois très loin des synapses, lieu de consommation majeure d'énergie. Les mitochondries sont accumulées dans les zones synaptiques mais sont synthétisées près du corps cellulaire. Elles sont indispensables aux processus de retour à l'équilibre après la neurotransmission (ré-équilibration des concentrations ioniques, reformation des protéines G couplées aux récepteurs, resynthèse et recaptage des neurotransmetteurs dans les vésicules synaptiques...). La migration des mitochondries le long des prolongements cellulaires des neurones (axones, dendrites) est effectuée le long des microtubules par un complexe moteur/adaptateur qui comprend trois éléments : la chaîne lourde de la kinésine, Miro à la surface externe de la mitochondrie et Milton faisant la liaison entre les deux protéines précédentes (Figure 6) {Liesa, 2009; Schwarz, 2013}.

Le troisième processus est le remodelage du réseau mitochondrial par les phénomènes de fusion et de fission. La fission est un processus GTP-dépendant par lequel un tubule mitochondrial se divise. La fusion est un processus, également GTP mais aussi potentiel membranaire dépendant, par lequel une mitochondrie fusionne avec une autre mitochondrie. Les processus de fusion et de fission sont contrôlés par l'intermédiaire de complexes protéiques (Figure 7). La fusion des membranes externes implique les mitofusines, Mfn1 et Mfn2, alors que celle des membranes internes fait intervenir Opa1. Ces protéines ont une grande similarité de structure et de mode d'action. Elles possèdent :

- un domaine GTPase,
- un domaine transmembranaire leur permettant de s'ancrer à la membrane,
- et des domaines « coiled-coil » permettant des interactions homotypiques ou hétérotypiques.

Les domaines coiled-coil des mitofusines sont orientés vers le cytoplasme et permettent une interaction entre les membranes externes de mitochondries adjacentes. Les fusions des membranes internes et externes sont indépendantes mais coordonnées {Legros, 2002; Piquereau, 2013; Okamoto, 2005; Chan, 2006}.

Les processus de fission font intervenir deux protéines : DRP1 (Dynamin-related Protein 1) et Fis1 (Mitochondrial Fission Protein 1). DRP1 est une protéine cytosolique avec

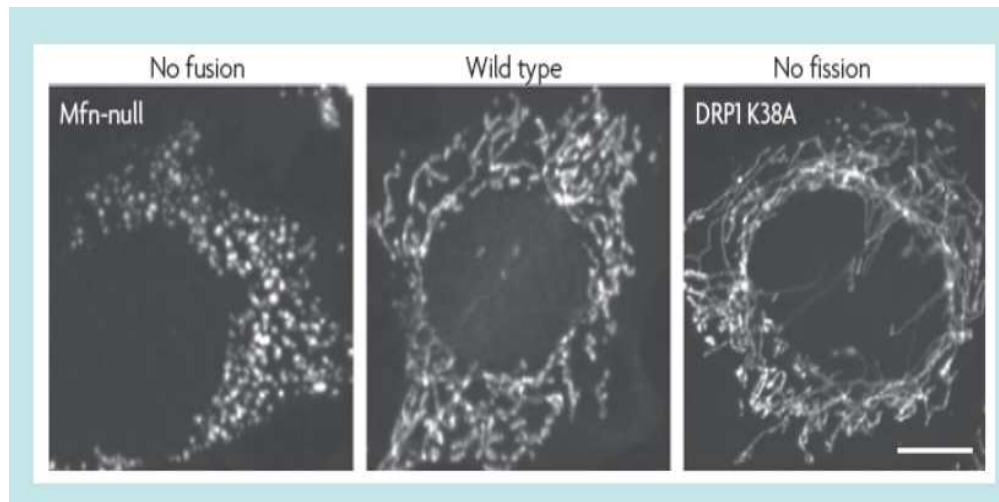


Figure 8 : Régulation de la morphologie mitochondriale par les mécanismes de fusion/fission

S.A.Detmer, Nature Review, 2007

À gauche : cellules n'exprimant ni MFN1 ni MFN2 → absence de fusion

Au centre : cellules contrôles

A droite : cellules exprimant une protéine DRP1 mutante, dominant négatif

→ absence de fission

un domaine GTPase. Elle se relocalise à la mitochondrie en utilisant la dynéine et le cytosquelette d'actine et en se liant à Fis1 qui est son récepteur sur la mitochondrie. Elle s'oligomérisse formant un anneau à l'endroit de la future fission. La constriction de cet anneau, sous l'action de remodelages structuraux des DRP1 liés à l'action de leur domaine GTPase, conduit à la division mitochondriale. DRP1 est modulée par le taux de calcium par l'intermédiaire de la calcineurine ainsi que par de nombreuses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, sumoylation...) qui modulent notamment sa dégradation par le protéasome {Kuzmicic, 2011}.

La fusion et la fission sont des processus permanents dont l'équilibre détermine la morphologie mitochondriale. En cas d'excès de fusion, les mitochondries sont plus « filamenteuses », tubulaires et interconnectées. A l'inverse, en cas de fission majoritaire, elles sont « fragmentées », plus petites, plus nombreuses et sphériques (Figure 8) {Detmer, 2007}.

L'implication des événements de fusion/fission dans la physiologie reste encore très débattue. Des fibroblastes n'exprimant ni MFN1 ni MFN2 ont des capacités respiratoires réduites. De plus, les mitochondries de ces cellules ont des formes et des potentiels membranaires très hétérogènes. Des fibroblastes n'exprimant pas OPA1 ont montré le même genre d'anomalies, le déficit respiratoire étant même plus poussé. Les modèles animaux d'invalidation ont permis de montrer que MFN2 après la naissance était indispensable au développement des cellules de Purkinje. La dynamique mitochondriale est impliquée dans la fragmentation induite par l'apoptose. Une inhibition de la fission entraîne une diminution de la fragmentation mitochondriale, du relargage de cytochrome *c* et peut retarder voire empêcher la mort cellulaire {Detmer, 2007;Chen, 2003}. Enfin il a récemment été remarqué que les cellules actives métaboliquement ont des mitochondries plutôt organisées en réseau alors que les cellules quiescentes présentent une majorité de mitochondries isolées. Toutefois, il existe une grande spécificité tissulaire en lien avec les fonctions cellulaires ; les cardiomyocytes sont par exemple métaboliquement actifs mais porteurs en majorité de mitochondries isolées {Piquereau, 2013}.

Les différents protagonistes de la dynamique mitochondriale ont un rôle en pathologie humaine. Des mutations de *MFN2* sont impliquées dans la pathologie de Charcot-Marie-Tooth de type 2 et des mutations d'*OPA1* entraînent des atrophies optiques dominantes. Des anomalies de la dynamique mitochondriale ont également été associées à des pathologies plus fréquentes telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer ou la chorée de

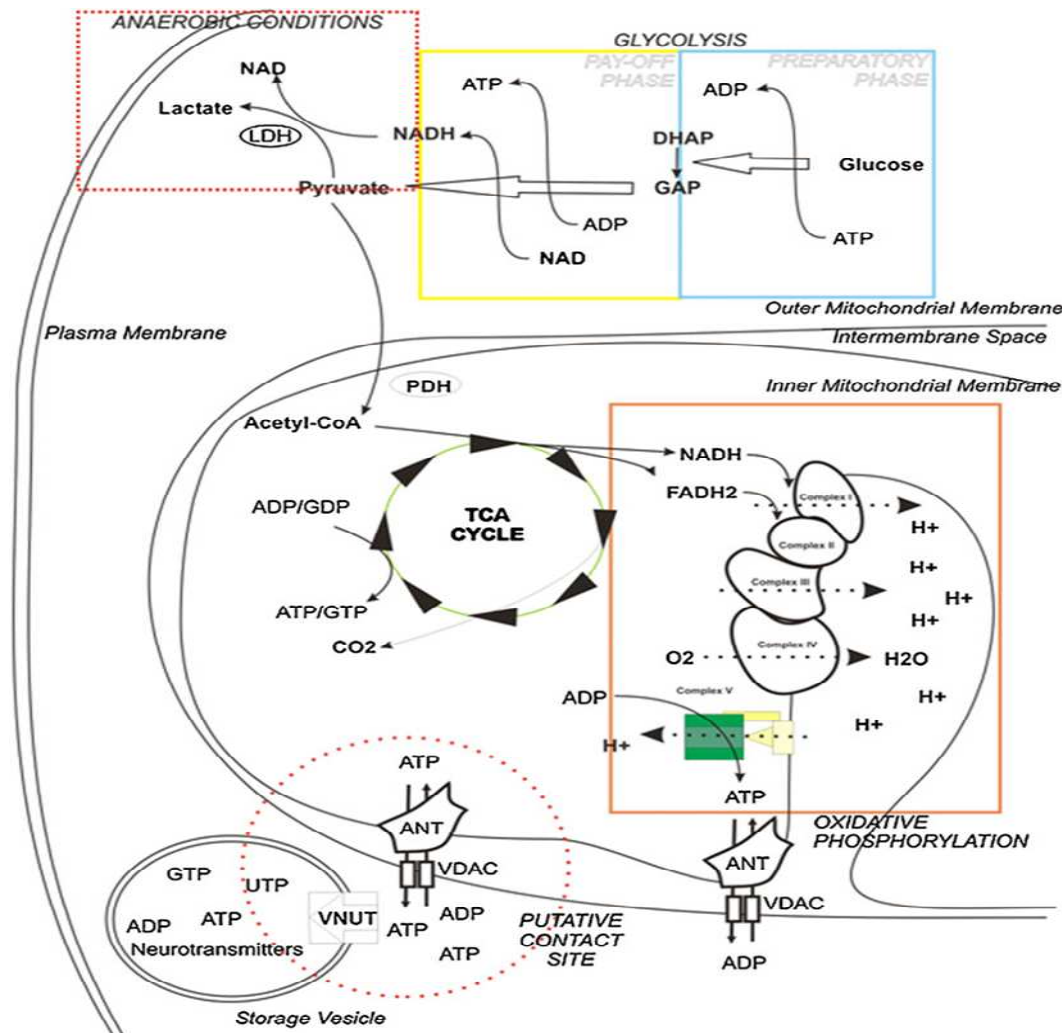


Figure 9 : Métabolisme du glucose

M. Bonora, Purinergic signalling, 2012

La glycolyse est représentée dans les encadrés bleu et jaune, le cycle de Krebs par le cercle vert et la chaîne des oxydations phosphorylantes dans l'encadré orange

TCA cycle : cycle de Krebs, DHAP : dihydroxyacetone phosphate, GAP : glycérade 3-phosphate, PDH : pyruvate déshydrogénase, VNUT : transporteur vésiculaire des nucléotides

Huntington. Dans la maladie d'Alzheimer, des études sur cellules et tissus de patients ont montré des niveaux bas de MFN1, MFN2 et OPA1 et des niveaux élevés de Fis 1 et DRP1. Dans la forme juvénile de la maladie de Parkinson due à des mutations sur des gènes impliqués dans la mitophagie comme *PARK2* ou *PINK1*, il semble qu'il y ait une dérégulation du métabolisme de MFN2 contrôlé par ces mêmes gènes {Ranieri, 2013}.

4. Fonctions mitochondriales

Les mitochondries participent à de nombreuses fonctions au sein de la cellule. Elles représentent tout d'abord la « centrale énergétique » de la cellule en étant à l'origine de la synthèse d'ATP par la chaîne des oxydations phosphorylantes. Parmi les fonctions les plus importantes, on retrouve également un rôle dans l'anaplérose (cycle de Krebs), l'oxydation de tous les substrats énergétiques issus des glucides (PDH), des lipides (β oxydation) et des acides aminés (transaminases, cycle de l'urée, cycle de Krebs), la synthèse de nombreux composés indispensables (cholestérol, hormones stéroïdes, hème, centres Fer-Soufre), l'homéostasie calcique, la modulation de la mort cellulaire, la production et la neutralisation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la thermogénèse. Certaines de ces fonctions ne sont présentes que dans les mitochondries de certains tissus montrant la spécialisation de ces organelles en fonction des organes : par exemple thermogénèse dans le tissu adipeux brun, cycle de l'urée dans le foie et partiellement le rein, synthèses hormonales dans la surrénale....

a) Métabolisme énergétique et synthèse d'ATP

Le catabolisme aérobie complet du glucose, source énergétique essentielle dans la majorité des tissus, implique trois différents processus : la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne des oxydations phosphorylantes (Figure 9). La glycolyse, de localisation cytoplasmique, aboutit à la production de deux molécules d'ATP, deux molécules de NADH et deux molécules de pyruvate. Le pyruvate est ensuite importé dans la mitochondrie par un transporteur spécifique qui vient d'être identifié {Herzig, 2012}. Il est oxydé et décarboxylé par la pyruvate déshydrogénase en acétylCoA et dioxyde de carbone. L'acétyl-CoA est ensuite pris en charge par le cycle de Krebs, se déroulant dans la matrice mitochondriale, conduisant à la production d'une molécule d'ATP ou de GTP, trois molécules de NADH et une molécule de FADH_2 .

Une autre source énergétique importante est représentée par les acides gras provenant de l'hydrolyse des triglycérides. Ces acides gras sont tout d'abord activés en acyl-CoA dans le cytosol et importés dans la matrice mitochondriale via le système carnitine / Carnitine

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION

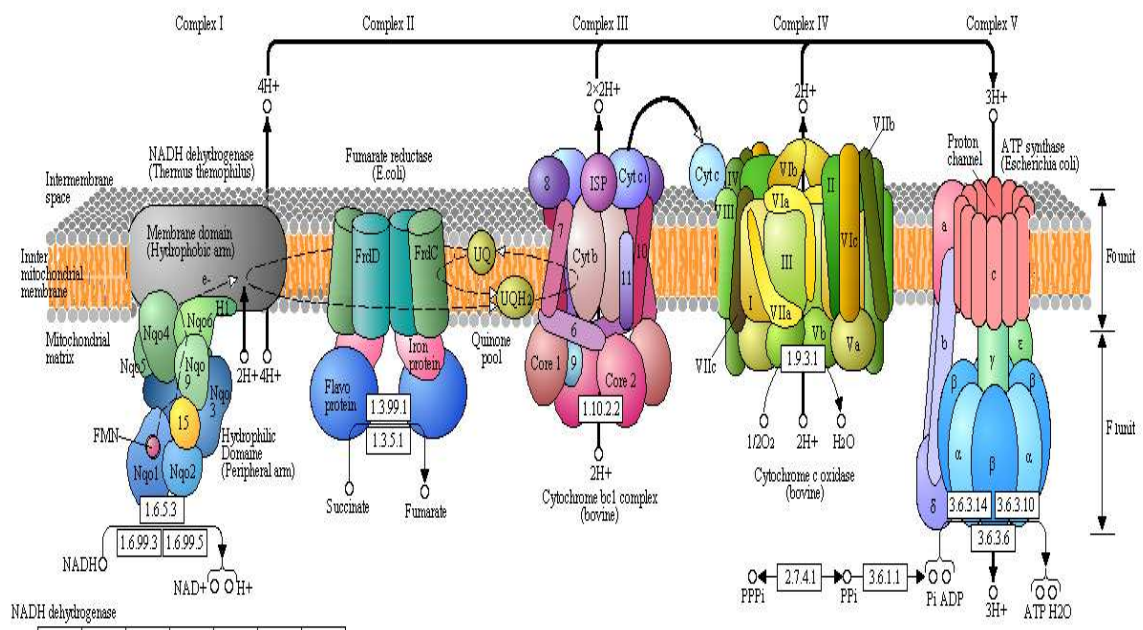


Figure 10 : Chaîne des oxydations phosphorylantes
<http://www.genome.jp/kegg-bin>

Palmitoyl Transférase. Leur dégradation par la β -oxydation aboutit pour un acide gras en C_n à $(0,5n-1)$ ($NADH$ et $FADH_2$), $0,5n$ acétylCoA, $1AMP$ et $2 Pi$ et consomme une molécule d'ATP.

La dégradation des acides aminés ne représente dans des conditions physiologiques normales que 10 à 20% du métabolisme oxydatif cellulaire. Elle converge vers le cycle de Krebs qui est donc alimenté par les métabolites dérivés des trois grands groupes de nutriments, ce qui en fait une plaque tournante pour les divers métabolismes. Ce métabolisme et les réactions qui y sont directement liées sont par conséquent appelés le métabolisme intermédiaire.

La ré-oxydation des dérivés réduits issus du métabolisme intermédiaire, à savoir le $NADH$ et le $FADH_2$, fait intervenir la chaîne des oxydations phosphorylantes qui comprend les quatre complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'ATP synthase ou complexe V (Figure 10).

Dans la plupart des cellules, environ 90% de l'ATP cellulaire est produit par la mitochondrie. En parallèle du transfert des électrons au travers de la chaîne respiratoire, les complexes I, III et IV pompent des protons de la matrice mitochondriale pour les rejeter vers l'espace intermembranaire. Le retour de ces protons à travers la sous-unité F_0 de l'ATP synthase entraîne une rotation de cette sous-unité ; le mouvement est transmis à la sous-unité F_1 de l'ATP synthase via la sous-unité γ , entraînant son changement conformationnel et la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de P_i . En effet, la structure trimérique de F_1 permet d'avoir trois états conformationnels différents liant soit $ADP+P_i$, soit ATP soit rien. Pour la synthèse d'une molécule d'ATP, le passage de 4 protons est nécessaire. Au total 12 molécules d'ATP sont synthétisées à partir d'une molécule d'acétyl-CoA ; 1 à partir du succinyl-CoA dans le cycle de Krebs et 11 dans la chaîne des oxydations phosphorylantes (9 à partir des 3 $NADH, H^+$ et 2 à partir d'1 $FADH_2$). Une fois synthétisé, l'ATP peut rester dans la matrice ou être transporté vers l'espace intermembranaire par l'ANT puis vers le cytoplasme par VDAC. {Davis, 2012; Bonora, 2012; Guérin, 2004}.

Le contrôle des flux métaboliques (consommation d'oxygène et synthèse d'ATP) semble être effectué au cours de différentes étapes de la phosphorylation oxydative et la répartition de ce dernier varie en fonction de l'état d'équilibre et des tissus. Rossignol et al ont étudié le coefficient de contrôle de sept éléments mitochondriaux (complexe I, complexe III, complexe IV, complexe V, ANT, transporteur phosphate et transporteur pyruvate) sur des mitochondries isolées de muscle, cœur, foie, rein et cerveau de rat. L'analyse a révélé deux groupes de tissus : d'une part le muscle et le cœur, contrôlés essentiellement au niveau de la

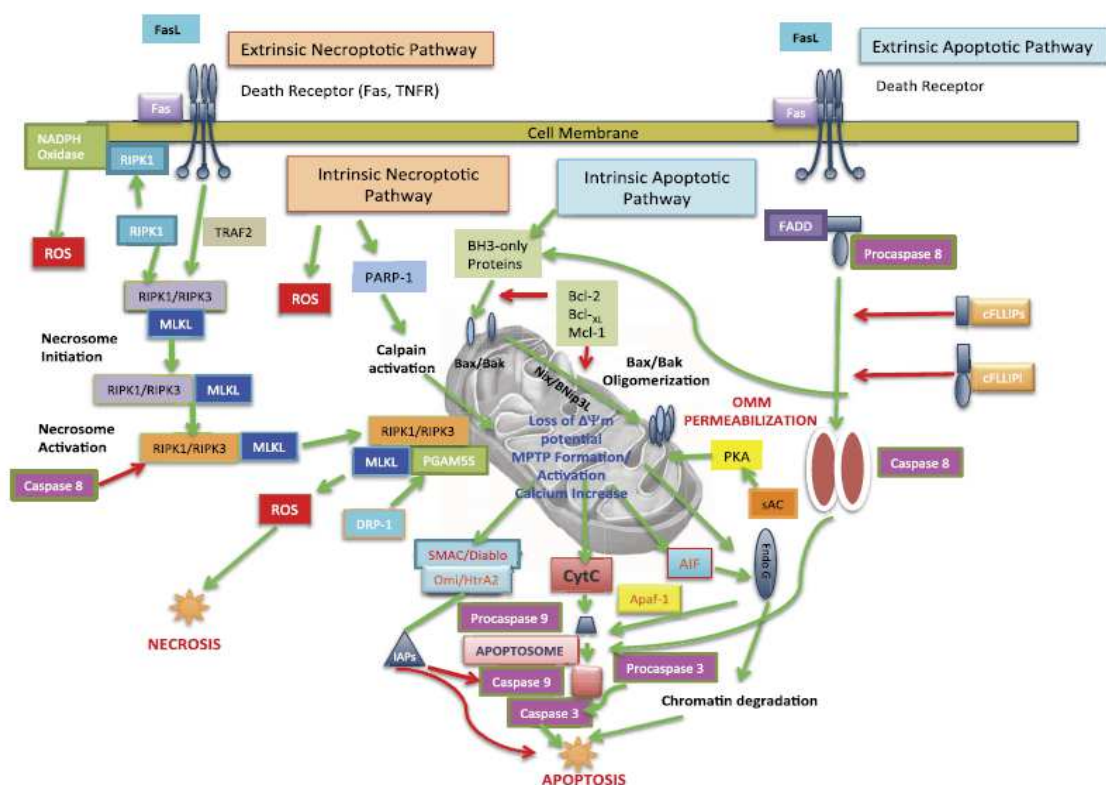


Figure 11 : Voies mitochondriales de mort cellulaire : nécrose et apoptose
R.Davis, The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2012
 Apaf : Apoptosis protease-activating factor ; Bax : Bcl-2-associated X protein ; Bak : Bcl-2 homologous antagonist killer ; Bcl : B-cell lymphoma protein ; BH3 : membres de la famille Bcl-2 ; EndoG : endonucléase G ; FADD : FAD domain protein ; FasL : Fas ligand type II transmembrane protein ; FLLIP : FADD-like interleukin-1beta-converting enzyme FLICE like inhibitory protein ; Mcl : induced myeloïd leukemia cell differentiation protein ; MLKL : Mixed-lineage kinase-domain-like protein ; Nix/Bnip3L : BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like ; PARP : poly(ADP) ribose polymerase ; RIPK : receptor interacting protein kinase ; TNFR : TNF receptor ; TRAF2 : TNF receptor-associated factor 2

chaîne respiratoire et d'autre part, le foie, le rein et le cerveau contrôlés essentiellement au niveau de la phosphorylation par l'ATP synthase et le transporteur phosphate. Leurs résultats sont les suivants :

- Complexe I et transporteur pyruvate : étapes majeures de contrôle quelque soit le tissu (sauf le rein),
- Complexe III et IV: étapes majeures de contrôle dans le muscle et le cœur,
- Complexe V et transporteur phosphate : étapes majeures de contrôle dans le foie, le rein et le cerveau,
- ANT : étape mineure de contrôle quelque soit le tissu.

On peut donc considérer que pour un complexe donné, plus son coefficient de contrôle est important dans un tissu, plus ce tissu sera sensible à un déficit, expliquant ainsi en partie la spécificité tissulaire de certaines maladies mitochondriales {Rossignol, 2000}.

b) Mort cellulaire

En 1842, Vogts parle pour la première fois de mort cellulaire lors d'une étude sur amphibiens. Historiquement, deux types de mort cellulaire existent et s'opposent. En 1972, Kerr, Willie et Currie définissent pour la première fois ces deux types de mort, à savoir l'apoptose et la nécrose {Kerr, 1972}.

L'apoptose, dont le nom dérive du terme grec désignant la chute de pétales ou de feuilles végétales à l'automne, est un mécanisme physiologique fortement régulé qui permet une élimination sélective des cellules avec conservation de l'intégrité de la membrane plasmique qui subit toutefois quelques modifications. L'apoptose a un grand rôle dans l'homéostasie tissulaire, le développement, la défense contre les infections virales et les atteintes génotoxiques. La mitochondrie est impliquée dans certains mécanismes induisant l'apoptose ; elle en est aussi l'effecteur indispensable par le biais de la libération de nombreux facteurs pro-apoptotiques localisés dans l'espace inter-membranaire (cytochrome *c*, Smac/Diablo, AIF, endonuclease G...).

La nécrose a longtemps été considérée comme un phénomène accidentel. Elle est initiée par des stimuli environnementaux. Elle résulte en une dérégulation rapide de l'homéostasie cellulaire et entraîne une perte de l'intégrité de la membrane cytoplasmique, un gonflement du cytoplasme et de la matrice mitochondriale et provoque une réponse inflammatoire. Là encore, la mitochondrie semble jouer un rôle.

L'apoptose peut être déclenchée par des signaux qui suivent deux voies, appelées voies extrinsèque et intrinsèque, qui diffèrent par leurs étapes précoces mais convergent ensuite pour activer une famille d'enzymes protéolytiques, ou caspases, protéases à cystéine dans le site actif, capables de cliver leur substrat au niveau d'un résidu acide aspartique. Chacune de ces voies initie l'apoptose en activant une caspase initiateur qui active à son tour par clivage des caspases effectrices communes.

Dans la voie extrinsèque, le signal est déclenché par la liaison de ligands aux récepteurs de mort comme le récepteur TNF (Tumor Necrosis Factor) dont le domaine cytoplasmique va recruter des molécules adaptatrices et la procaspase 8 ou 10. Ces dernières vont ensuite activer les caspases effectrices pour l'activation de l'apoptosome, à savoir les caspases 3, 6 et 7 soit directement, soit par l'intermédiaire des protéines de la famille Bcl2 qui vont agir sur la perméabilité de la membrane mitochondriale externe.

La voie intrinsèque peut quant à elle être mise en route par une grande variété de stress cellulaire. Elle fait intervenir la mitochondrie de façon précoce par les protéines de la famille Bcl2 qui induisent la libération de protéines de l'espace intermembranaire dans le cytosol. Une des principales protéines relarguées est le cytochrome *c*, intervenant majeur dans la chaîne de transport des électrons entre les complexes III et IV. Ce dernier va se lier avec Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor 1) et la procaspase 9 pour former l'apoptosome responsable de l'activation des caspases 3 et 7. La régulation de cet apoptosome se fait par XIAP, capable de lier les formes actives des caspases 3 et 9. Les antagonistes de XIAP sont les protéines mitochondriales Smac/DIABLO et Omi/HtrA2. D'autres protéines mitochondriales vont intervenir dans la fragmentation de l'ADN comme AIF ou dans la dégradation de l'ADN nucléaire comme l'endonucléase G.

Le mécanisme moléculaire précis de la libération des protéines mitochondriales reste sujet à controverse. Un des mécanismes serait l'ouverture du pore de transition mitochondrial. Ce dernier a longtemps été considéré comme constitué d'ANT, VDAC, le récepteur aux benzodiazépines et la cyclophiline D. Des études récentes font suspecter de nouveaux constituants et suggèrent que le pore de transition serait formé par des dimères de l'ATP synthase. Il existerait de plus une interaction entre la cyclophiline D et la sous-unité OSCP (Oligomycin Sensitivity-Confering Protein) de la partie latérale de l'ATP synthase {Giorgio, 2013}. L'ouverture du pore entraînerait une dérégulation de l'homéostasie calcique, un gonflement de la mitochondrie et enfin la rupture de la membrane externe. L'autre mécanisme serait la formation de pores spécifiques dans la membrane externe par les membres de la famille Bcl-2. Cette famille comprend des molécules pro-apoptotiques comme Bax ou des

molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2. Les membres de la famille Bcl2 peuvent également réguler l'apoptose par interaction avec le pore de transition.

Parmi les facteurs impliqués dans la modulation de l'apoptose intrinsèque, un rôle important semble joué par le flux d'électrons au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet des niveaux dérégulés de Bcl-2 ont été observés dans des cellules ayant une chaîne respiratoire défectueuse et l'ajout d'un agent découplant avant l'induction d'un stimulus pro-apoptotique retarde l'activation des caspases {Kwong, 2007}.

Comme l'apoptose, la nécrose possède deux types de voie, la voie extrinsèque impliquant des récepteurs de mort et la voie intrinsèque nécessitant la production d'ERO et l'activation de la voie PARP-1/calpaïne. Au décours de la voie extrinsèque, un nécrosome se forme qui active la GTPase DRP-1 induisant une fragmentation mitochondriale {Davis, 2012}.

La mitochondrie est donc impliquée dans tous les processus de mort cellulaire (Figure 11) {Davis, 2012; Nicholls, 2002; Bras, 2005; Kroemer, 1998; Anthony L DeFranco, 2009}.

c) Homéostasie calcique

Le calcium joue un rôle central dans l'organisme et plus particulièrement au niveau cellulaire où le signal calcique est étroitement associé à de nombreux mécanismes de signalisation cellulaire : régulation de kinases, de phosphatases, de complexes Ca^{2+} /calmoduline qui modulent l'action de nombreuses protéines et l'expression de gènes précoces. Ces régulations sont impliquées dans des phénomènes aussi divers que la contraction musculaire, l'exocytose, le chimiotactisme, la croissance dendritique, la différenciation et la croissance cellulaire, la phototransduction dans les cellules visuelles, le contrôle de la méiose et de l'apoptose {Humbert, 1995}.

La mitochondrie intervient dans la régulation de la concentration cytoplasmique de calcium. Le pool cytoplasmique de Ca^{2+} est très limité et sa concentration est généralement maintenue entre 0,05 et 0,5 μM . La mitochondrie est capable de réagir très rapidement à des variations de concentration cytoplasmique liées soit à des échanges au travers de la membrane plasmique soit à un relargage du réticulum endoplasmique, lequel est situé à proximité des mitochondries dans la plupart des cellules. Le seuil maximal d'accumulation mitochondriale en calcium est d'environ 0,5 μM dans la plupart des cellules, ce seuil étant un peu augmenté dans les neurones {Nicholls, 2002}. Pour pouvoir répondre rapidement aux variations de concentration calcique, il existe des transporteurs sur les membranes externe et interne mitochondriales. Au niveau de la membrane externe, le canal anionique voltage dépendant

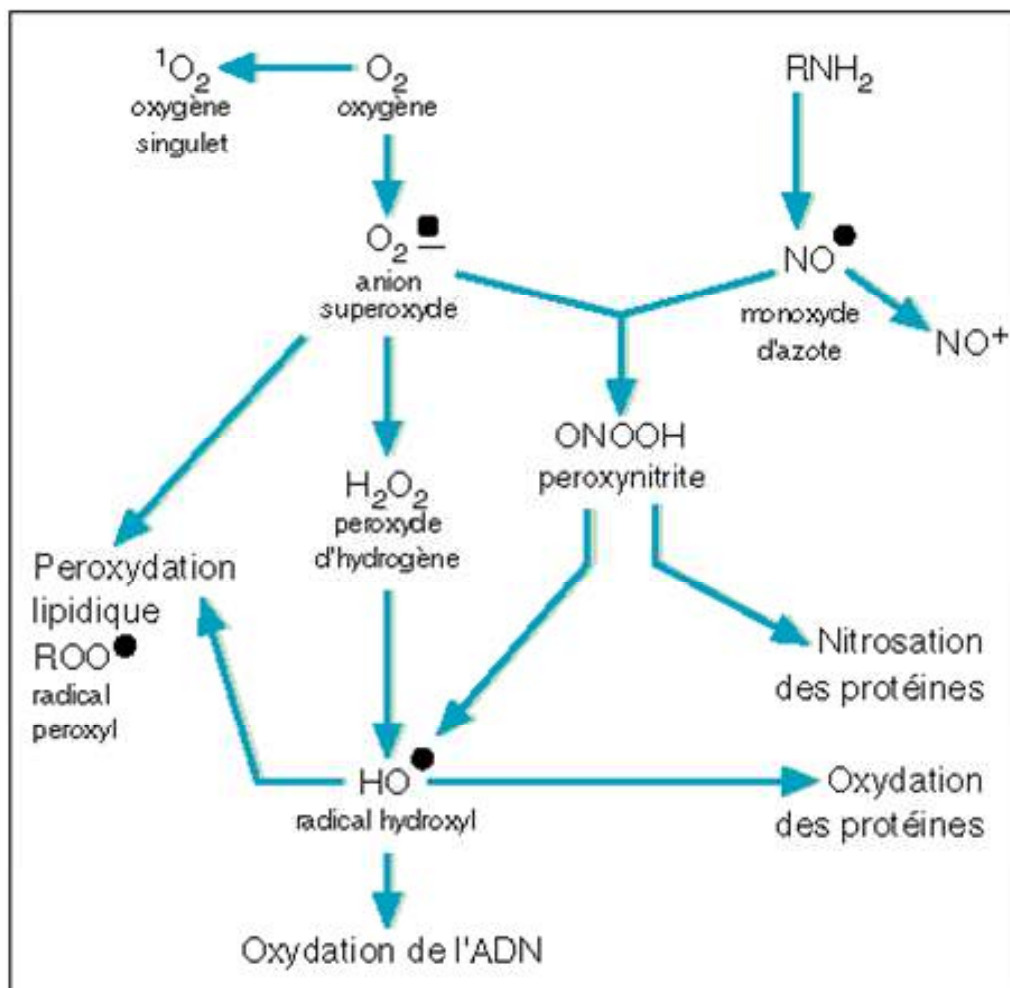


Figure 12 : Nature et relations entre les principaux radicaux libres (dont l'électron non apparié est figuré par le symbole "rond noir") et espèces réactives de l'azote et de l'oxygène intervenant dans le phénomène de stress oxydant

A.Favier, *Annales de Biologie Clinique*, 1997

(VDAC) permet de réguler l'entrée de l'ion calcique dans l'espace intermembranaire. Il existe plusieurs transporteurs calciques dans la membrane interne mitochondriale : des échangeurs calcium contre Na^+ et/ou H^+ qui servent surtout pour l'efflux calcique et l'uniporteur calcique qui a été récemment identifié et serait un complexe protéique de 40 kDa, Na^+ -dépendant dans le cœur et le cerveau et Na^+ -indépendant dans le foie et le rein. {Glancy, 2012 ; De Stefani, 2011; Baughman, 2011}.

5. Mitochondrie et stress oxydant

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) et les défenses anti-oxydantes. Il se traduit par l'accumulation de lésions oxydatives des composants cellulaires (protéines, lipides et acides nucléiques).

a) Les différentes ERO et ERN

Les ERO sont des espèces réactionnelles dérivant de l'oxygène moléculaire. Elles comprennent des radicaux libres mais aussi des espèces non-radicalaires. Halliwell et al ont défini un radical libre comme une espèce chimique ayant une existence indépendante et comportant un ou plusieurs électrons non-appariés {Halliwell, 2006} ; parmi les ERO on trouve l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ ou le radical hydroxyl OH^\bullet . Les espèces non-radicalaires correspondent au peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 .

Les ERN sont des espèces dérivant de l'azote moléculaire. Elles sont constituées de formes ioniques telles que le peroxyde d'azote ONOO^- et de formes non-ioniques telles que le monoxyde d'azote NO (Figure 12) {Turrens, 2003; Gibson, 2008}.

L'anion superoxyde a une demi-vie très courte. Il est à l'origine d'autres ERO, essentiellement le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde d'azote, mais aussi l'ion hydroxyl. Le peroxyde d'hydrogène peut diffuser librement dans le cytosol et joue un rôle important dans les différentes activités cellulaires. Il peut également générer des radicaux hydroxyles HO^\bullet soit en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} , ou de Cu^+ (Réaction de Fenton dont l'équation est : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^+) \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}(\text{Cu}^{2+})$), soit en présence d'ion superoxyde (réaction de Haber-Weiss dont l'équation est : $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{OH}^- + \text{O}_2$). Le radical hydroxyl est le plus réactif des ERO et est responsable de la plupart des effets cytotoxiques de ces derniers.

b) Production des ERO et des ERN

Toutes les ERO sont synthétisées à faible taux lors de l'exécution des fonctions physiologiques de la cellule. L'anion superoxyde est produit par de nombreuses sources au sein de la cellule. Parmi elles, on retrouve les NADPH oxydases membranaires, dont la fonction est la production d'ion superoxyde, mais également d'autres enzymes qui en produisent de façon parallèle à leur réaction propre comme le cytochrome P450, les cyclooxygénases, les lipooxygénases et la xanthine oxydase.

Toutefois, dans une grande partie des cellules sans rôle direct de production des ERO, la source majeure de production est la mitochondrie. Au sein de cette dernière, les complexes I et III de la chaîne respiratoire sont majoritairement impliqués. Le complexe I ou NADH-coenzyme Q oxydoréductase catalyse l'oxydation du NADH et le transfert d'électrons au coenzyme Q. Le site exact de production d'anion superoxyde dans le complexe I est encore incertain ; il peut s'agir soit du site de la flavine mononucléotide soit du site de liaison de la quinone {Kadenbach, 2012}. Le complexe III catalyse, quant à lui, le transfert d'électrons du coenzyme Q réduit vers le cytochrome *c* via le cycle Q. Au cours de ce cycle que nous verrons ultérieurement, une forme intermédiaire semi-oxydée ou semi-ubiquinone est synthétisée et semble être la source de production de l'anion superoxyde au sein du complexe III {Lenaz, 2001}. La part de ces deux complexes dans la formation d'anion superoxyde est variable en fonction des tissus ; la contribution du complexe III est majoritaire dans le cœur alors qu'il s'agit de celle du complexe I dans le cerveau {Bolisetty, 2013 ; Barja, 1999}. Récemment un rôle du complexe II dans la modulation de la production d'anion superoxyde par les complexes I et III a été évoqué {Kadenbach, 2012}. D'autres sources mitochondriales d'ERO existent comme la glycérol-3-phosphate déshydrogénase, la monoamine oxydase, la dihydrolipoamide déshydrogénase ou l'ETF (Electron-Transferring-Flavoprotéine) déshydrogénase {Turrens, 2003}.

Le monoxyde d'azote est généré pendant la transformation de l'arginine en citrulline par une famille d'enzymes NADPH-dépendantes, les NOS (Nitric Oxide Synthases) dont il existe plusieurs isoformes. Récemment, Lacza et son équipe ont identifié une isoforme mitochondriale {Lacza, 2003}.

c) Les défenses anti-oxydantes

La mitochondrie consomme 90% de l'oxygène cellulaire et produit des ERO en permanence. Elle possède donc ses propres moyens de détoxification.

La superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD ou SOD de type 2) est présente dans la matrice mitochondriale. Elle permet la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. La superoxyde dismutase à cuivre et zinc (CuZnSOD ou SOD1) est, quant à elle, présente dans l'espace intermembranaire en plus du cytosol.

Les glutathion peroxydases (GPx) sont des enzymes à sélénium, qui décomposent le peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion. Le peroxyde d'hydrogène peut également être dismuté en eau et oxygène par la catalase soit après diffusion dans le cytoplasme pour la plupart des tissus soit directement dans la mitochondrie en ce qui concerne les cellules cardiaques {Radi, 1991}.

Les peroxyredoxines sont des enzymes capables de dégrader non seulement le peroxyde d'hydrogène, mais aussi les peroxydes organiques en formant des ponts disulfure entre leurs dimères, grâce à leurs résidus cystéinyl {Yamashita, 1999}. Parmi elles, la peroxyredoxine 3 est exclusivement mitochondriale.

De nombreuses autres molécules non-enzymatiques ont des propriétés anti-oxydantes comme le glutathion, l'acide ascorbique (vitamine C) ou encore l'alpha-tocophérol (vitamine E).

Dans des conditions pathologiques, une augmentation de la production d'ERO par des mitochondries dérégulées peut être à l'origine de dommages cellulaires importants au niveau lipidique, protéique et des acides nucléiques. Ces altérations peuvent encore réduire les fonctions mitochondriales entraînant un cercle vicieux et la mort cellulaire.

A l'état physiologique, les ERO interviennent dans de nombreux processus cellulaires tels que l'autophagie (via la voie des récepteurs mTOR et la voie des MAPK), l'homéostasie vasculaire, la réponse à différents stress... Les ERO modulent l'expression de diverses enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase à manganèse {St Clair, 2002}.

Ils interagissent avec divers facteurs de transcription tels que NF-κB (Nuclear Factor-κB), AP-1 (Activator Protein 1) ou encore Nfr-2 (NFE2 related factor) découvert plus récemment. Nfr-2 possède une structure de type leucine-zipper et est capable de se lier à des séquences cible appelées ARE (Antioxidant Responsive Element). A l'état basal, Nfr-2 est localisé dans le cytoplasme où il est associé à l'actine par l'intermédiaire d'une protéine d'ancrage Keap-1. Le stress oxydant conduit à la rupture de l'association Nfr-2/Keap1/actine

Nombre de copies d'ADN mt / cellule	Espèce	Type cellulaire	Nombre de copies d'ADN mt par nucléoïde	Etude
8800	Homme	HeLa		Bopenhagen 1974
1100	Souris	L		Bopenhagen 1974
7200	Homme	HeLa		Shmookler 1983
7200	Homme	KB		Shmookler 1983
2933	Homme	Fibroblaste		Shmookler 1983
5200	Homme	Fibroblaste		Shmookler 1983
800	Homme	Fibroblaste		Robin 1988
720	Souris	LA9		Robin 1988
500	Homme	A2780	1,4	Satoh 1991
12900	Homme	Fibroblaste		Tang 2000
1632	Homme	Fibroblaste	2,3	Legros 2004
1961	Homme	Fibroblaste	2,4	Legros 2004
2637	Homme	HeLa	5,7	Legros 2004
4126	Homme	143B	7,5	Legros 2004
3500	Homme	ECV304	7,3	Iborra 2004
2721	Homme	Fibroblaste	1,4	Kukat 2011
821	Souris	3T3	3	Brown 2011

Tableau 1 : Mesure du contenu en ADN mitochondrial par cellule et par nucléoïde
D'après D.Bopenhagen, BBA, 2012

probablement en modifiant la structure des micro-filaments d'actine ou en oxydant des cystéines particulièrement sensibles de Keap-1. Cela entraîne alors la translocation de Nrf-2 dans le noyau où il va pouvoir activer la transcription {Delattre, 2005 ; Jaiswal, 2004}. Les ERO interagissent également avec le réseau mitochondrial. Le peroxyde d'hydrogène, le monoxyde d'azote et l'anion superoxyde sont en effet des inducteurs de fission provoquant la fragmentation mitochondriale {Bolisetty, 2013}.

B. Génétique mitochondriale

La génétique mitochondriale est caractérisée par la double origine génétique de la chaîne des OXPHOS : génome nucléaire et génome mitochondrial.

1. ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial a été découvert il y a environ 45 ans grâce à la microscopie électronique par Nass sur mitochondries de foie de poulet et Schatz sur mitochondries de levure {Mounolou, 2005}.

a) Structure

L'ADN mitochondrial est une molécule circulaire de 5 µm de diamètre qui comprend 16569 paires de bases chez l'être humain. Les deux brins de l'ADN se différencient par leur composition nucléotidique : le brin lourd (H pour Heavy) est riche en purines et le brin léger (L pour Light) riche en pyrimidines.

Le génome mitochondrial ne possède pas la structure chromatinienne caractéristique de l'ADN nucléaire des eucaryotes. Il est associé à des protéines non-histone, ces dernières permettant sa compaction au sein des nucléoïdes. Par technique PALM (PhotoActivated Light Microscopy), les nucléoïdes ont pu être décrits comme de forme ovoïde d'environ 10 nm de diamètre. La compaction de l'ADN mitochondrial est donc très importante car cette longueur correspond normalement à environ 300 paires de bases.

La composition des nucléoïdes est encore l'objet de beaucoup d'incertitudes du fait des difficultés techniques de sa détermination. Elle comprendrait à priori {Bogenghagen, 2012}:

- des protéines impliquées dans la réplication et la transcription comme mt-SSB (Single Strand DNA Binding protein), TFAM (Transcription Factor A of Mitochondria),
- une hélicase (Twinkle),
- des protéines chaperonnes telles que HSP60, HSP 70 et DNAJ3,

des protéases, Lon et Clpx,

- des enzymes du métabolisme lipidique tels que HADHA, HADHB et ATAD3,
- et des protéines ribosomales.

Les nucléoïdes sont associés à la membrane interne mitochondriale de façon espacée le long des crêtes. Satoh et Kuriowa, lors d'une étude effectuée en microscopie à fluorescence en utilisant le marqueur DAPI ont montré l'existence de 3,2 nucléoïdes et 4,6 molécules d'ADN mitochondrial en moyenne par organite dans des cellules humaines A2780 {Satoh, 1991}. Le nombre de molécules d'ADN par nucléoïde semble varier fortement en fonction du type cellulaire de même, par conséquent, que le nombre de copies d'ADN mitochondrial par cellule pouvant aller de quelques dizaines à des milliers (Tableau 1). Ce nombre est très discuté en fonction des études. Les résultats de microscopie confocale, très utilisée à l'origine pour la détermination du nombre de nucléoïdes, ont été critiqués dans la mesure où le signal détecté peut provenir en partie de plans voisins. Les études plus récentes ont été faites avec des anticorps dirigés contre l'ADN ou encore TFAM à la place des marqueurs fluorescents et avec des méthodes de haute résolution (Stimulated Emission Depletion ou PhotoActivated Light Microscopy) {Bogenghagen, 2012}. Les résultats de ces différentes études sont présentés dans le Tableau 1.

L'ADN mitochondrial porte 37 gènes, 28 sur le brin lourd et 9 sur le brin léger, tous dédiés au fonctionnement de la chaîne des OXPHOS (Figure 13). 24 de ces gènes codent pour des produits ARN matures : 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomaux. Les 13 autres gènes codent pour des protéines de la chaîne des OXPHOS. La région codante de l'ADN représente 93% de la molécule et il n'existe pas de région intronique. Certains gènes comme *MT-ATP6* et *MT-ATP8* ont même des zones chevauchantes. La plupart des gènes sont contigus, seulement séparés par une ou deux paires de bases non –codantes. Une seule région est non-codante, la D-loop. Elle comprend le site d'initiation de la réplication du brin lourd (O_H) et les promoteurs de transcription (HSP1, HSP2 et LSP) (Figure 13) {Chinnery, 2013 ; Holt, 2003}.

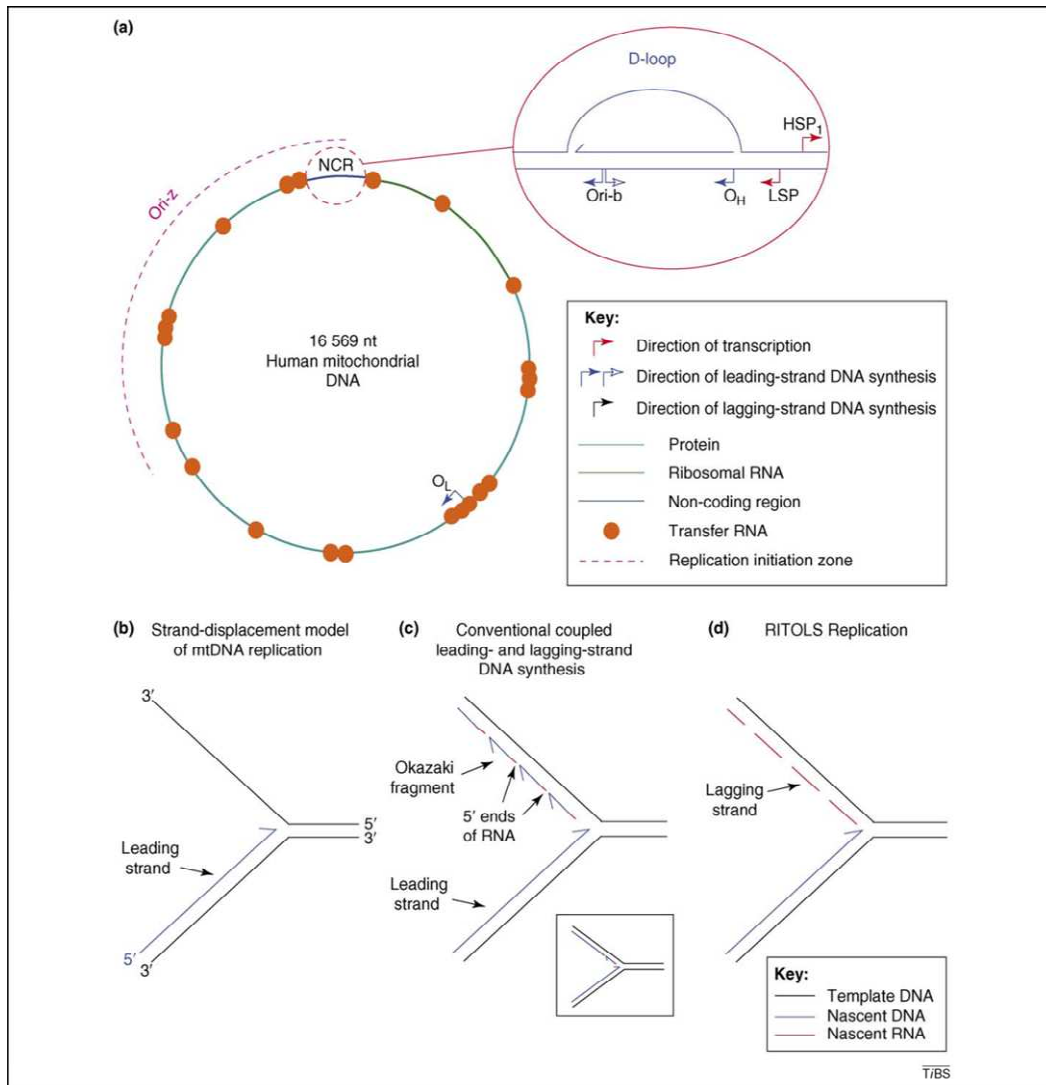


Figure 14 : trois modèles de réplication de l'ADN mitochondrial

I. Holt, Trends in biochemical sciences, 2009

a) Molécule d'ADN mitochondrial et D-loop

b) Modèle asynchrone ou SDM (Strand-Displacement Mechanism)

c) Modèle synchrone

d) Modèle Ritols (Ribonucleotide Incorporation Throughout the Lagging Strand)

b) Réplication

Le génome mitochondrial possède deux origines de réplication : l'origine de réplication du brin lourd (O_H) qui est localisée dans la D-loop, et l'origine de réplication du brin léger (O_L) qui est localisée au deux tiers du génome à partir de l'origine de réplication du brin lourd.

Dans la mitochondrie de cellule humaine, la réplication du brin lourd serait initiée par un transcrit produit directement par l'ARN polymérase à partir du promoteur LSP. Cette initiation spécifique est permise par le facteur de transcription TFAM {Dairaghi, 1995} associé à l'ARN polymérase mitochondriale. L'ARN synthétisé peut être utilisé pour la transcription ou la réplication. Cependant, pour qu'il serve d'amorce à une ADN polymérase, l'ARN doit être coupé au niveau du site O_H par la RNase MRP (Mitochondrial RNA Processing). L'extrémité 3'OH libre résultant de la coupure est utilisée par l'ADN polymérase, et la synthèse du brin lourd H peut commencer.

Plusieurs modèles de réplication ont été proposés (Figure 14). Le premier est le modèle asymétrique ou SDM (Strand-Displacement Mechanism). La synthèse du brin lourd démarre au niveau de O_H et se poursuit jusqu'au 2/3 de la molécule d'ADN. A cet endroit se trouve le site d'initiation de la réplication du brin léger O_L . Ce dernier est alors exposé sous forme simple brin et la synthèse du brin léger peut alors commencer. Le deuxième est le modèle RITOLS (Ribonucleotide Incorporation Throughout the Lagging Strand). Ce modèle est similaire au modèle asynchrone mais il se différencie de ce dernier car des ARN intermédiaires sont produits au cours de la réplication avant d'être convertis en ADN. Enfin, le dernier mécanisme proposé par ordre chronologique est celui d'un modèle synchrone ou symétrique. Dans ce cas, les deux brins sont répliqués en même temps. La réplication démarre au niveau d'un seul site d'initiation, probablement proche de O_H voire identique. Il serait comparable à celui de l'ADN nucléaire avec une fourche de réplication bidirectionnelle et une synthèse discontinue du brin L par fragments d'Okazaki successifs.

La terminaison de la réplication de l'ADN mitochondrial est relativement mal connue. Quand les fourchettes de réplication des deux brins se rencontrent, la molécule d'ADN forme une structure en X avant de se séparer en deux molécules filles {Holt, 2003 ; Holt, 2009 ; Holt, 2000 ; Holt, 2012}.

Pour sa réplication l'ADN mitochondrial dépend de protéines codées par le génome nucléaire. Les principaux protagonistes de la réplication sont les suivants :

- TFAM (Transcription Factor A of Mitochondria) : c'est une molécule capable de se lier sur les sites des promoteurs de transcription (HSP 1 et 2 et LSP). Cette protéine de 25 kDa appartient à la famille des protéines HMG (High Mobility Group). Elle peut entourer le duplex d'ADN et entraîner une courbure de la molécule. Elle possède deux autres rôles : un contrôle positif sur l'initiation de la transcription et un rôle structural dans la maintenance de l'ADN {Dairaghi, 1995}.
- POLG (Polymérase γ) : c'est l'ADN polymérase mitochondriale. C'est une enzyme trimérique formée d'une sous-unité α catalytique de 140 kDa et de deux sous-unités β accessoires de 55 kDa. Le domaine N-terminal de la sous-unité α porte une activité 5'-3' exonucléase et son extrémité C-terminale une activité polymérase. Cette enzyme sera détaillée ultérieurement dans la seconde partie de ce manuscrit.
- mt-SSB (Single Strand DNA Binding protein) : cette protéine peut se lier à l'ADN simple-brin, le plus souvent sous forme d'homotétramère, et stabilise les régions simple-brin de la D-loop et les intermédiaires de réplication.
- RNase MRP : ribonucléoprotéine composée d'un fragment ARN et de plus d'une dizaine de protéines chez les eucaryotes. Elle permet le clivage de l'ARN complémentaire du brin léger qui sert d'amorce pour l'initiation de la réplication du brin lourd.
- ARN polymérase mitochondriale
- Twinkle ayant un domaine C-terminal à activité hélicase {Chinnery, 2013}.

c) Transcription

Les mécanismes impliqués dans la transcription de l'ADN mitochondrial ont été mis à jour à partir des années 80 par Attardi et Clayton {Attardi, 1982 ; Clayton, 1991; Holt, 2003}. La transcription est similaire à celle des procaryotes et chaque brin d'ADN va être transcrit en ARN messenger précurseur polycistronique. Le brin lourd est transcrit en deux unités chevauchantes. L'une démarre au site H1, localisé dans le promoteur HSP1 en position 561 et comprend les ARN de transfert de la phénylalanine et de la valine ainsi que les ARN ribosomaux. Le second démarre en H2 en position 646 dans HSP2 et couvre presque tout le brin lourd. La transcription du brin léger se fait en une seule fois et démarre au site L localisé dans le promoteur LSP en position 407. Ces grands transcrits sont ensuite clivés au niveau de

structures tRNA-like par des endonucléases de type RNase P. Enfin, il y a libération d'ARNt qui sont modifiés et maturés, d'ARNm qui vont être polyadénylés, créant les codons STOP de fin de traduction, et les ARN ribosomiques.

Les acteurs de cette transcription sont :

- L'ARN polymérase mitochondriale ou POLRMT : elle se lie de façon non spécifique aux promoteurs HSP et LSP. Elle est similaire aux ARN polymérases des bactériophages bien que cette similitude concerne seulement la moitié C-terminale de l'enzyme,
- TFAM (cf paragraphe « réplication) : il se lie à 12 et 39 paires de bases respectivement par rapport à H1 et L. Ces liaisons sont nécessaires à l'exécution d'une transcription efficace,
- Les facteurs de transcription mitochondriale TFB1M et TFB2M : ces facteurs de 40 kDa sont co-exprimés et interagissent directement avec la polymérase,
- TEFM (Transcription Elongation Factor Mitochondrial),
- MTERF1 (Mitochondrial TERmination Factor 1) chargé de la terminaison des transcrits matures {Chinnery, 2013; Holt, 2003; Montoya, 2006}.

d) Traduction et code génétique

La traduction mitochondriale ressemble à celle des procaryotes. Elle utilise un code génétique différent du code génétique universel. Elle n'utilise que 22 ARNt contre 30 pour la traduction cytoplasmique. Les deux codons stop sont AGA et AGG au lieu de UGA, UAA et UAG. UGA code par contre pour le tryptophane. AUA code pour la méthionine et non pour l'isoleucine.

La machinerie traductionnelle mitochondriale comprend des facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison de la traduction, des protéines mitochondriales ribosomales, des synthétases aminoacyl-tRNA synthetases et une méthionyl-tRNA transformylase.

La traduction bactérienne implique trois facteurs d'initiation IF1, IF2 et IF3. Seuls IF2 et IF3 ont été retrouvés pour la mitochondrie. Ces derniers vont permettre l'assemblage du complexe d'initiation. L'élongation est ensuite contrôlée par de nombreux facteurs : mtEF-Tu, mtEF-Ts, and mtEF-G. EF-Ts est un facteur d'échange nucléotidique liant le complexe EF-Tu/guanosine diphosphate (GDP) et permettant la libération de GDP et la formation d'un complexe hétérodimérique stable EF-Tu/EF-Ts. Le guanosine triphosphate (GTP) permet ensuite la dissociation de l'EF-Ts et régénère un complexe EF-Tu/GTP pouvant lier un autre aminoacyl-ARNt. Ce complexe ternaire s'associe ensuite avec le site A ribosomal et quand une association correcte codon/anticodon se produit, le GTP est hydrolysé libérant le

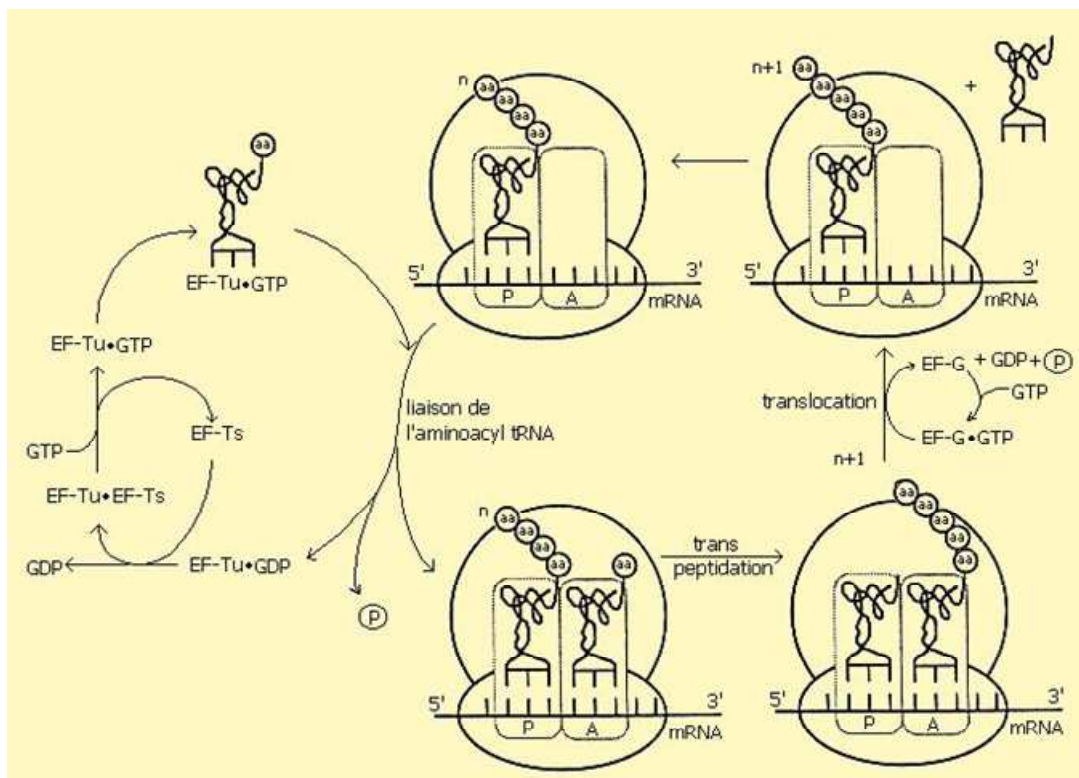


Figure 15 : phase d'élongation lors de la traduction procaryotique
<http://www.cours-de-biochimie.fr/traduction-am-proteines.php>

complexe EF-Tu/GDP. Le cycle peut ensuite se répéter. EFG1 catalyse quant à lui l'hydrolyse du GTP (Figure 15). Le processus de terminaison dans les mitochondries n'a pas encore été entièrement élucidé. Deux facteurs de relargage, mtRF1 et mtRF1a (ou HMRF1L), et un facteur de recyclage (mtRRF) ont été identifiés et partiellement caractérisés {Chinnery, 2013; Holt, 2003; Smits, 2010 ; Smeitink, 2006 ; Coenen, 2004}.

e) Protéines codées par l'ADN mitochondrial

Le protéome mitochondrial humain comporte environ 1 500 protéines dont la plupart sont codées par le génome nucléaire. Comme nous l'avons vu précédemment, l'ADN mitochondrial code seulement pour 13 protéines. Elles appartiennent aux complexes I, III, IV et V. Il s'agit des sous-unités ND1 à ND6 et ND4L du complexe I, du cytochrome b du complexe III, des sous-unités COX I à III du complexe IV et des sous-unités ATP 6 et 8 du complexe V {May-Panloup, 2004}.

f) Hérité et hétéroplasmie

La transmission maternelle non mendélienne de l'ADNmt est une des particularités de la génétique mitochondriale {Gyllensten, 1985}. En effet, il existe des mécanismes de reconnaissance et de destruction des mitochondries paternelles suite à des processus d'ubiquitinylation démarrés au cours de la spermatogénèse. La destruction de l'ADN mitochondrial paternel est effectuée par le protéasome ovarien au plus tard lors de la troisième division cellulaire embryonnaire. De plus le nombre de copies d'ADN mitochondrial dans le spermatozoïde varie de 10 à 100 contre 50000 à 400000 dans l'ovule {May-Panloup, 2004}. A ce jour, un seul cas de transmission paternelle a été rapporté chez un homme souffrant de myopathie mitochondriale liée à une délétion de deux paires de bases {Schwartz, 2002}. De nombreuses études ont toutefois été réalisées sur le sujet et certaines rapportent des cas de transmission « non-maternelle » de l'ADN mitochondrial {Bandelt, 2005}. Il existe par contre de nombreux cas dans le règne animal {Chinnery, 2013}.

L'homoplasmie, c'est-à-dire l'existence d'une séquence unique de la molécule d'ADNmt dans toutes les cellules, est la règle dans la plupart des organismes vivants. Toutefois l'homoplasmie peut être modifiée par de nombreux facteurs au cours de la vie. L'hétéroplasmie correspond à la coexistence, dans une cellule ou un tissu, de plusieurs types de génomes mitochondriaux qui diffèrent par leur séquence. A ce jour, de nombreuses études génétiques chez l'Homme ont montré que l'hétéroplasmie mitochondriale est un phénomène courant.

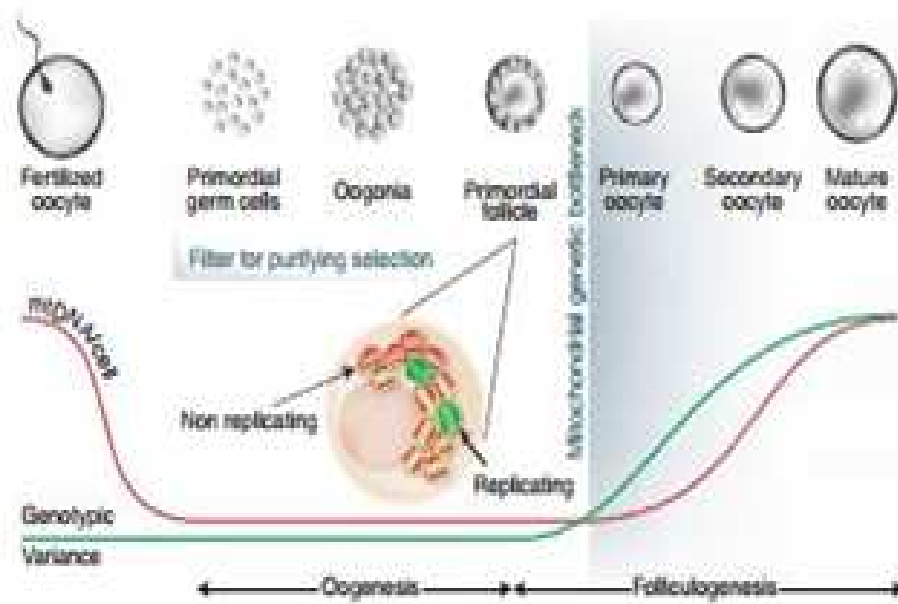


Figure 16 : Goulot d'étranglement génétique mitochondrial ou « bottleneck »
T. Wai, Nature genetics, 2008

Une femme hétéroplasmique pourrait en théorie transmettre son ADNmt hétéroplasmique à sa descendance. Cependant ce phénomène est contrecarré par ce que l'on appelle l'effet « bottleneck » (goulot d'étranglement). Une ségrégation des variants d'ADN mitochondrial est en effet observée entre la mère et l'embryon. Pour expliquer cet effet, deux hypothèses ont été proposées. La première hypothèse était que pendant la maturation de l'oocyte primaire, le nombre de copies d'ADN mitochondrial augmentait approximativement de 1000 à 10000. La sélection et la réplication d'une sous-population pendant ce procédé permettrait donc une rapide dérive de la fréquence de certains génotypes en une seule génération. La deuxième hypothèse était que cette ségrégation se produisait pendant les phases précoces du développement de l'embryon. Selon les travaux de l'équipe de Shoubridge, il semble que la première hypothèse soit la plus probable. Cette équipe a notamment montré une réduction très importante du nombre de molécules d'ADN mitochondrial dans les ovogonies primitives puis une croissance exponentielle pendant la folliculogénèse (Figure 16) {Jenuth, 1996 ; Wai, 2008}.

g) Haplogroupes et haplotypes

Un haplogroupe est ensemble d'haplotypes qui sont des séries d'allèles situés à des sites spécifiques dans un chromosome et qui sont largement distribuées au sein des individus d'une population. Des études RFLP (Restriction Fragment-Length Polymorphism) de l'ADN mitochondrial d'une large cohorte de populations ont permis de révéler ces allèles définissant des haplogroupes et dérivant d'un ancêtre commun. Grâce à la transmission uniparentale, ces haplogroupes ont évolué indépendamment. Concernant l'ADN mitochondrial, plus de deux douzaines d'haplogroupes sont connus pour la population humaine dans le monde. L'arbre phylogénétique de l'ADN mitochondrial est enraciné en Afrique et se ramifie dans différentes régions géographiques. En Europe, neuf haplogroupes principaux sont connus (H, I, J, K, T, U, V, W, X) {Zapico, 2013 ; Singh, 2009}.

2. ADN nucléaire

a) Protéines synthétisées

Toutes les protéines mitochondriales, que leur origine soit procaryote ou eucaryote, à l'exception des 13 codées par l'ADN mitochondrial, sont codées par le génome nucléaire.

La biogénèse mitochondriale nécessite donc la coordination de l'expression des deux génomes, nucléaire et mitochondrial, ainsi qu'un système efficace d'importation et

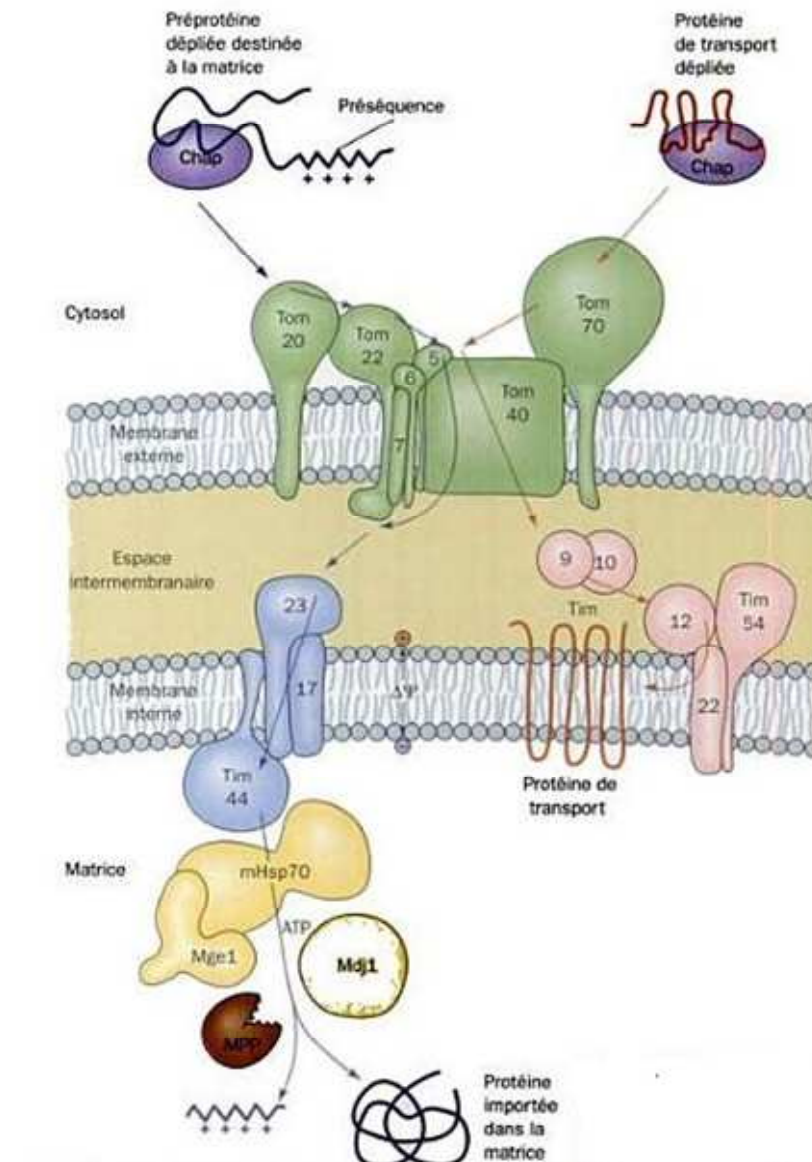


Figure 17 : Import des protéines à la mitochondrie
D.Voet, Biochimie, 2005
 TOM : Translocase of Outer Membran
 TIM : Translocase of Inner Membran

d'assemblage des protéines que nous verrons ultérieurement. Parmi les protéines mitochondriales codées par l'ADN nucléaire, se trouvent de nombreux enzymes et facteurs impliqués dans la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN nucléaire, des sous-unités de tous les complexes de la chaîne des OXPHOS, des facteurs d'assemblage, des protéines chaperonnes, des facteurs de biogénèse etc...

b) Import des protéines à la mitochondrie

La majorité des protéines mitochondriales sont donc des protéines importées du cytosol via une séquence d'adressage. Dans le cytosol, afin de pouvoir être importées à la mitochondrie, ces protéines en configuration « dépliée » vont s'associer à des chaperonnes ATP-dépendant tels que HSP70 ou MSF (Facteur Stimulant l'importation Mitochondriale) { Voet, 2005 }. Au sein de la mitochondrie, quatre localisations sont possibles : membrane externe, espace intermembranaire, membrane interne et matrice (Figure 17).

Les protéines destinées à la matrice, soit la majorité des protéines mitochondriales, présentent des séquences d'adressage N-terminales de 20 à 60 résidus riches en chaînes latérales basiques et hydroxylées et n'ayant pas ou presque pas de chaînes latérales acides. Ces pré-séquences forment des hélices amphipathiques en solution { Voet, 2005 }. Les protéines destinées à l'espace intermembranaire ou à la membrane externe sont synthétisées sous forme de précurseurs à séquence signal N-terminal α -amphipathique et à signal hydrophobe. Enfin les protéines de la membrane interne sont synthétisées sous forme de précurseurs à multiples domaines transmembranaires { Guerin, 2013 }.

L'importation des protéines passe premièrement par la translocation au travers de la membrane externe via le complexe TOM (Translocase of Outer Membran) d'environ 400 kDa. Les séquences signal des pré-protéines vont tout d'abord interagir avec des récepteurs mitochondriaux Tom 20 et Tom 70. Le complexe Tom 20/Tom22 reconnaît les pré-séquences N-terminales en liant la partie hydrophobe de leur hélice α . Les pré-protéines ayant des séquences signal hydrophobes internes se lieront plutôt avec Tom 70. Les protéines passent ensuite de Tom 20 ou Tom 70 à Tom 40 constitué de feuillets β et contenant un canal hydrophile par lequel passent les protéines. Tom 40 est étroitement associé à Tom 22, Tom 5, Tom 6 et Tom 7. Tom 22 est essentielle pour l'intégrité du complexe TOM et possède des séquences de liaison du côté cytoplasmique et du côté de l'espace intermembranaire. Tom 5 interviendrait dans le transfert des pré-protéines de Tom 22 vers Tom 40 et joue également un rôle dans la biogénèse de Tom 40. Enfin, Tom 6 et Tom 7 régulent de façon antagoniste la dynamique d'assemblage du complexe TOM. Le passage des précurseurs au sein du

complexe TOM est mieux compris pour les protéines contenant une pré-séquence. Après avoir été reconnus par Tom20, les précurseurs lient les domaines cytosoliques de Tom 22 et Tom 5, passent par le pore polaire de Tom 40 et vont finalement s'associer avec un site acide du côté trans de TOM constitué par Tom 40, Tom 7 et le domaine inter-membranaire de Tom 22 {Dudek, 2013 ; Fox, 2012}.

Les protéines peuvent ensuite emprunter quatre voies : insertion dans la membrane externe, localisation dans l'espace inter-membranaire, insertion dans la membrane interne et passage dans la matrice mitochondriale.

La porine, Tob 55, Tom 40 et Mdm 10 sont des protéines constituées de feuillets β et localisées dans la membrane externe. Après avoir traversé le complexe TOM, les précurseurs à feuillets β sont pris en charge par de petits complexes de l'espace inter-membranaire dont notamment Tim9/Tim10. Ces précurseurs vont ensuite retourner du côté de la membrane externe grâce une séquence signal localisée sur leur dernier feuillet β , être délivrés au complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery), et s'insérer dans la bicouche lipidique de la membrane externe mitochondriale {Dudek, 2013; Fox, 2012}.

Tim 9, Tim 10, Cox 17, Tim 8, Tim 13 sont des protéines de l'espace inter-membranaire. Elles comportent un signal d'adressage comprenant un résidu cystéine et une séquence hydrophobe. A sa sortie du complexe TOM, le signal est reconnu par une protéine de l'espace inter-membranaire Mia 40. Les cystéines sont ensuite oxydées par le complexe Mia 40/Erv1 et ainsi libérées dans l'espace inter-membranaire {Dudek, 2013; Fox, 2012}.

Les protéines destinées à la matrice vont généralement emprunter le complexe TIM23 (Translocase of Inner Membran) aussi appelé Tim17/Tim23 pour aller vers leur localisation finale. Le système moteur de ce complexe, situé du côté de l'espace inter-membranaire de la membrane interne, comprend Tim 44, Hsp70 mitochondriale (mHsp 70) et le facteur d'échange nucléotidique GrpE. La translocation dépend du potentiel membranaire et requiert l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Le potentiel membranaire sert probablement à transporter par « électrophorèse » la séquence signal N-terminale chargée positivement dans la matrice, laquelle est négative par rapport à l'espace intermembranaire. L'ATP est quant à lui utilisé par mHsp 70 qui vient se lier à Tim 44 et agirait en tirant telle une crémaillère le précurseur protéique à travers TIM 23. Une fois dans la matrice, la séquence signal est enlevée par une peptidase matricielle de maturation (MPP). La protéine peut ensuite se replier et reprendre sa configuration native {Voet, 2005}.

Enfin, la membrane interne mitochondriale étant imperméable à pratiquement toutes les substances polaires, elle comprend de nombreuses protéines de transport de métabolites

qui permettent l'entrée de substrats et la sortie de produits. L'ATP/ADP translocase ou le transporteur du phosphate en sont des exemples. Ces protéines sont transportées de TOM au complexe TIM22, constitué de cinq sous-unités, via le petit complexe Tim9/Tim10 ; aucune interaction directe entre TOM et TIM22 n'a été mise en évidence {Dudek, 2013; Ferramosca, 2013}.

C. Pathologies mitochondriales

Bien que de multiples réactions cellulaires autres que la chaîne des OXPHOS soient aussi localisées dans les mitochondries, les « maladies mitochondriales » sont définies comme les maladies dues à un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale des OXPHOS {DiMauro, 2004}.

Ces pathologies touchent 2,5 individus sur 10000 et sont considérées comme les plus fréquentes des maladies métaboliques. Elles peuvent survenir à n'importe quel âge et avec différents modes d'hérédité. De plus, la symptomatologie des maladies mitochondriales est très variable car presque tous les tissus peuvent être atteints. Certaines pathologies sont restreintes à un tissu, d'autres sont pluri-systémiques même si le déficit prédomine souvent sur les organes les plus consommateurs d'énergie. Les symptômes dépendent de la sévérité du déficit et de sa répartition tissulaire {Chabrol, 2011 ; Munnich, 2001}.

1. Génétique

Les mutations connues comme responsables des maladies mitochondriales sont multiples. Elles peuvent être portées par l'ADN mitochondrial ou par l'ADN nucléaire.

a) ADN mitochondrial (ADNmt)

De nombreuses mutations délétères concernent l'ADNmt. Elles peuvent être des remaniements de grande taille (délétions, éventuellement associées à des duplications) ou des mutations ponctuelles. Elles coexistent le plus souvent au sein de la cellule avec une population résiduelle d'ADNmt non muté. Cette hétéroplasmie complique les analyses phénotypiques. En effet, pour la plupart de ces mutations, le taux d'hétéroplasmie détermine l'impact sur la sévérité d'un éventuel déficit des activités ou sur celle des symptômes cliniques. De plus, la ségrégation mitotique peut entraîner une hétérogénéité de distribution tissulaire qui doit être prise en compte lors du diagnostic notamment pour le choix du tissu analysé {Lombes, 2013}.

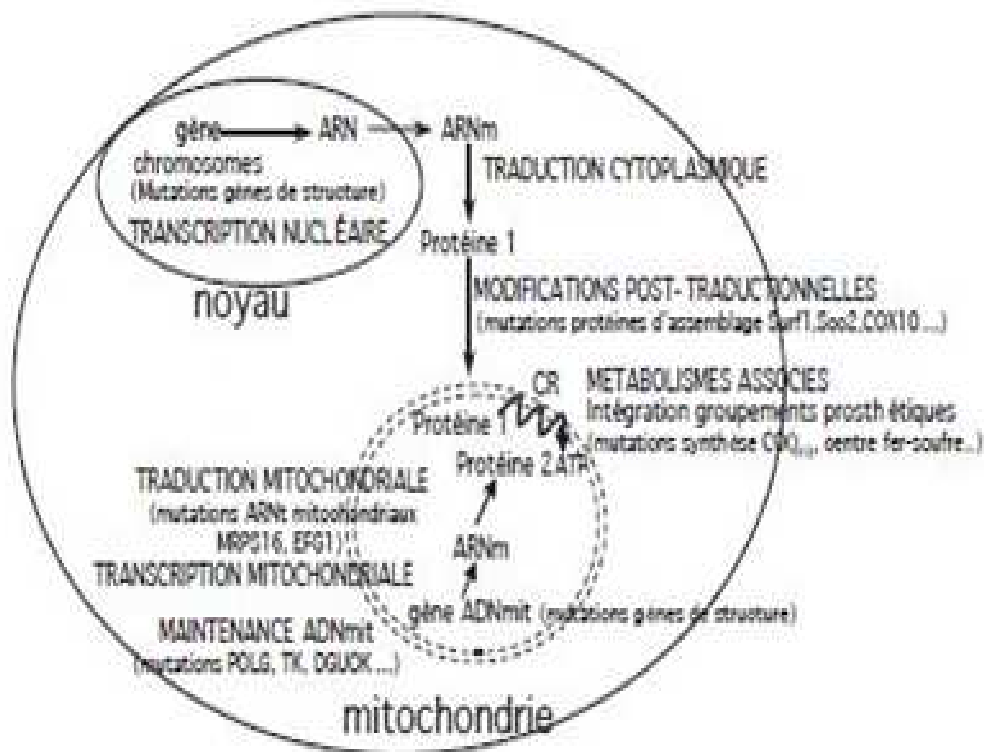


Figure 18: Interaction entre les deux génomes pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale

K.Auré, 2007, Rev. Neurol.

CR : chaîne respiratoire mitochondriale ; ADN mit : ADN mitochondrial ;
 ARNm : ARN messagers ; ARNt : ARN de transfert ; POLG : Polymérase
 Gamma ; TK : Thymidine kinase 2 ; DGUOK : Déoxyguanosine kinase

Les délétions de grande taille de l'ADN mitochondrial ont été les premières mutations décrites dans les maladies mitochondriales. Leur prévalence est de 1,2/100000. Elles peuvent être de taille très variable et de conséquence pathologique diverse tant sur le plan biochimique que clinique. Leur localisation est également variable mais presque toujours située sur l'arc majeur entre les origines de répllication O_H et O_L . La plus fréquente est une délétion de 4.9 kilobases enlevant la région située entre les gènes du cytochrome b et de la sous-unité COX II. Certains patients peuvent avoir des duplications qui ne sont pas pathogènes en elles-mêmes mais qui peuvent évoluer vers des délétions pathogènes.

Plus d'une centaine de mutations ponctuelles pathogènes de l'ADN mitochondrial ont été rapportées depuis leur première description en 1988 et de nouvelles mutations sont encore régulièrement décrites de nos jours { www.mitomap.org }. Seule une minorité de ces mutations sont confirmées sur la base de la démonstration directe de leur pouvoir pathogène ou de leur récurrence dans des familles indépendantes { Schon, 2012 }. Les mutations répertoriées sont à l'origine de nombreux syndromes que nous verrons ultérieurement mais également de tableaux pauci-symptomatiques comprenant diabète, cardiomyopathie, surdité neuro-sensorielle... Une même mutation peut être associée à différents phénotypes et un même phénotype peut être associé à différentes mutations { Chinnery, 2000 ; Schapira, 2006 }.

b) ADN nucléaire

72 des 85 sous-unités de la chaîne mitochondriale des OXPHOS sont d'origine nucléaire. De plus, l'ADN nucléaire est impliqué dans de nombreux aspects nécessaires au fonctionnement de la chaîne des OXPHOS comme l'importation, l'assemblage, le contrôle de la qualité, la répllication et l'expression de l'ADN mitochondrial... (Figure 18).

Il existe différentes classifications de ces gènes dont aucune n'a réellement été acceptée de façon uniforme { Aure, 2007; Chabrol, 2011; DiMauro, 2004; Schapira, 2006 }. Une de ces classifications propose 6 classes selon le type de protéine codée { Camaret, 2009 } :

- Protéines de structure : complexe I (*NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS7, NDUF8, NDUF8B, NDUFB6, NDUFS8, NDUFS6*), complexe II (*SDH A,B,C,D*), complexe III (*UQCRCB, UQCRCQ, UQCRC2*), complexe IV (*COX6B1*), et complexe V (*ATP5E*)
- Facteurs d'assemblage : parmi les principaux : *SDHAF1* pour le complexe II, *BCS1, TTC19, LYRM7* pour le complexe III, *SURF1, COX10, COX15*... pour le complexe IV ou *TMEM70, ATP12* pour le complexe V

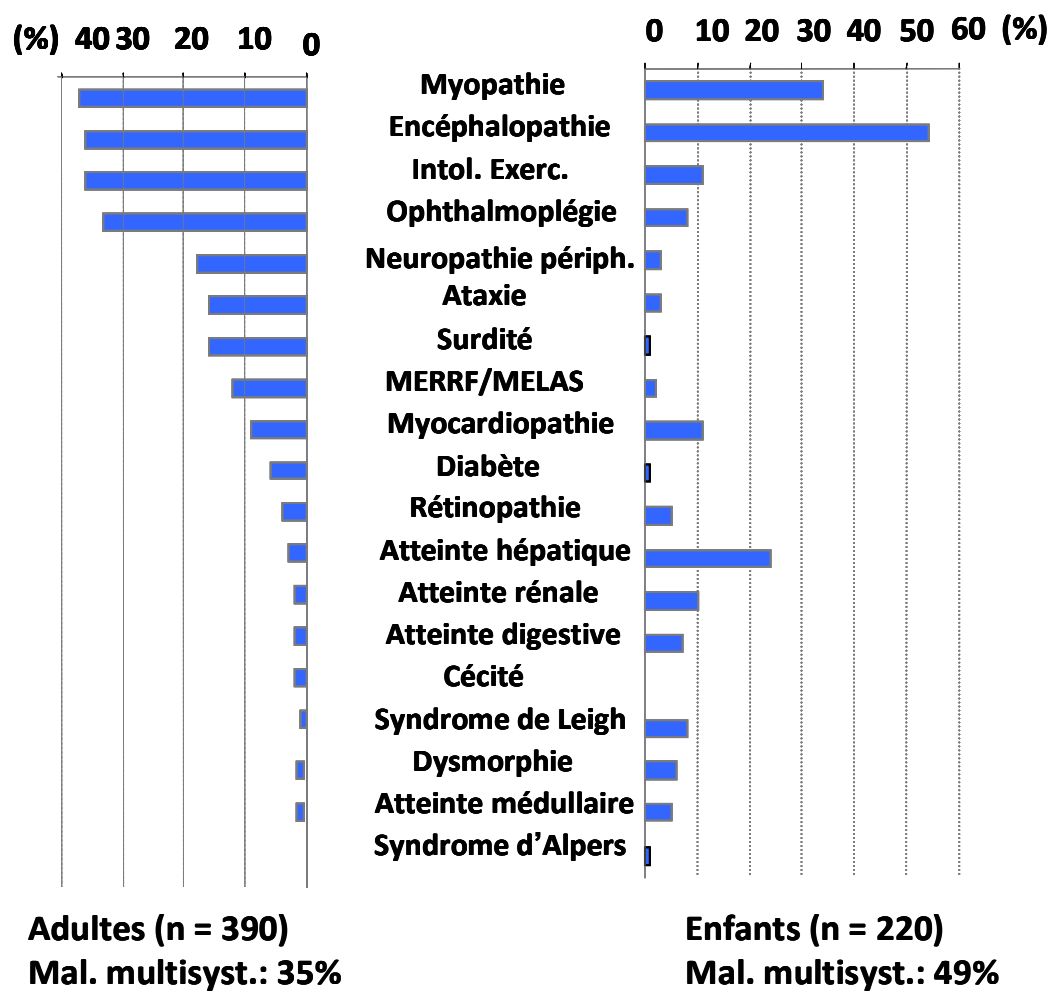


Figure 19 : Clinique des maladies mitochondriales
K.Auré ,Ann Pathol, 2004
 Intol.Exer. : intolérance à l'exercice
 Mal.multisyst : maladie multisystémique
 Neuropathie périph : neuropathie périphérique

- Protéines impliquées dans la biogenèse des centres redox : *SCO1* et *SCO2* pour l'incorporation du cuivre dans le complexe IV par exemple, gènes de la biosynthèse du coenzyme Q...
- Facteurs intervenant dans la réplication de l'ADN mitochondrial : soit *TYMP*, *TK2*, *DGUOK*, *ANT1*, *SUCLA2*, *RRM2B* qui régulent le pool de nucléosides/nucléotides, soit *POLG* ou *PEO1* qui interviennent directement dans le réplisome (complexe protéique de réplication) de l'ADN mitochondrial :
- Facteurs impliqués dans la dynamique mitochondriale : *OPA1*, *MFN2*.
- Facteurs impliqués dans la synthèse des protéines mitochondriales : *EFG1*, *YARS2*, *DARS2*, *MRPS16*.

2. Clinique

Les relations génotype/phénotype sont réputées complexes dans les maladies mitochondriales. Le fait qu'un même symptôme clinique puisse avoir des causes biochimiques et/ou génétiques différentes est une généralité en médecine. A l'inverse le fait qu'un même déficit puisse induire des présentations cliniques très différentes a souvent été considéré comme synonyme de relations génotype/phénotype très complexes.

Pour les maladies mitochondriale dues à l'altération d'un gène nucléaire, cette constatation doit être pondérée par le fait qu'un même déficit peut avoir de nombreuses causes génétiques différentes. Celles-ci ont une grande probabilité d'induire des mécanismes divers qui sous-tendent les différences de présentations cliniques. En dehors des différences de sévérité des mutations diminuant plus ou moins l'activité résiduelle des enzymes, il est donc simplement impossible d'affirmer que les maladies mitochondriales dues à des gènes nucléaires ont des relations génotype/phénotype anormalement diverses dans la mesure où la cause génétique de la majorité de ces maladies reste inconnue.

La situation pour les maladies dues à des mutations portées par l'ADN mitochondrial est, quant à elle, particulière du fait des complications induites par la possible hétéroplasmie de ces mutations. Il reste cependant tout à fait remarquable que des mutations spécifiques donnent le plus souvent des tableaux cliniques assez proches pour être reconnus en tant que syndromes (par exemple le syndrome de MERRF et la mutation m.8344A>G).

Il demeure que, prises dans leur ensemble, les maladies mitochondriales présentent une très grande diversité de symptômes. Celle-ci peut provenir des différences d'expression tissulaire du gène altéré. Bien que les tissus atteints soient principalement le muscle et le système nerveux, d'autres organes peuvent être atteints de façon concomitante ou voire même

prédominante : foie, rein, système hématopoïétique, et tractus digestif. L'atteinte progressive de nouveaux organes pendant l'évolution de la maladie est très caractéristique des maladies mitochondriales. Chez l'enfant, les anomalies sont le plus souvent pluriviscérales touchant le système nerveux central, le foie, le rein, le cœur... alors que chez l'adulte les atteintes neuromusculaires sont les plus fréquentes (Figure 19). Les muscles oculaires mais aussi proximaux (responsables des mouvements de l'épaule, du coude, du pelvis, des genoux) ou axiaux (responsables des mouvements du tronc) sont très souvent atteints {Lestienne, 1999; McFarland, 2007; Milone, 2013}

Parmi les atteintes monoviscérales, on peut citer la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON) qui est la plus fréquente des maladies mitochondriales causées par une mutation ponctuelle de l'ADN mitochondrial avec une prévalence de 11,82 pour 100000. La diminution initiale d'acuité visuelle n'affecte, en général, qu'un seul œil et est le plus souvent brutale. Trois mutations (m.11778G>A, m.3460G>A et m.14484T>C) regroupent à elles seules 95% des cas {Yu-Wai-Man, 2014}.

Il existe également des syndromes bien différenciés causés par des anomalies du génome mitochondrial (Figure 20 et Tableau2) ou du génome nucléaire.

Le syndrome MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy Lactic Acidosis and Stroke-like episodes) survient de manière générale avant l'âge de 40 ans. La symptomatologie est caractérisée par des épisodes récurrents de vomissements et de migraines avec déficit neurologique évoquant un accident vasculaire cérébral. La principale mutation responsable, retrouvée dans 80% des cas, est m.3243A>G dans le gène de l'ARN de transfert de la leucine, codon UUR (*MT-TL1*) mais une douzaine d'autres mutations peuvent en être à l'origine {Goto, 1990 ; Holt, 2003}.

Le syndrome MERRF (Myoclonus Epilepsy with Ragged Red Fibers) est caractérisé par une épilepsie, des myoclonies, une myopathie et une ataxie cérébelleuse. La mutation m.8344A>G dans le gène de l'ARN de transfert de la lysine (*MT-TK*) est retrouvée chez 80% des patients.

Le syndrome NARP (Neuropathy Ataxia Retinis Pigmentosa) est dû à différentes mutations du gène *MTATP6* dont les plus fréquentes sont m.8993T>G et m.8993T>C. Il se manifeste chez de jeunes adultes par une rétinite pigmentaire et une neuropathie sensorielle responsable d'ataxie. Certains patients porteurs des mêmes mutations en proportion très élevée, proche de 100%, présentent un tableau clinique très sévère de la petite enfance appelé syndrome de Leigh et caractérisé par une encéphalopathie progressive avec retard mental et atteinte des noyaux gris centraux et du tronc.

Le syndrome MNGIE (Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalomyopathy) comporte ophtalmoplégie, ptosis, pseudo-obstruction gastro-intestinale, leucoencéphalopathie, neuropathie périphérique démyélinisante et myopathie. Des mutations causales ont été identifiées sur le gène de la thymidine phosphorylase (*TYMP*).

L'ophtalmoplégie externe chronique progressive (CPEO pour Chronic Progressive External Ophthalmoplegy) est une des présentations les plus communes chez l'adulte qui associe parésie des muscles oculomoteurs et ptosis. Ses causes sont la présence d'une délétion de grande taille de l'ADNmt, de mutations ponctuelles de l'ADNmt ou des mutations de gènes nucléaires de maintenance de l'ADNmt (*POLG*, *PEO1*, *ANT1*...).

Le syndrome de Kearns-Sayre (KSS) est quant à lui caractérisé par la survenue avant l'âge de 20 ans d'une ophtalmoparésie et d'une rétinite pigmentaire. Sa sévérité est due à la coexistence constante d'atteintes diverses comme une ataxie cérébelleuse, une atteinte cardiaque avec trouble de la conduction et cardiomyopathie, un retard mental ou une démence progressive et une épilepsie. Ce syndrome est également dû à la présence de délétion de grande taille de l'ADNmt.

Le syndrome de Leigh vu plus haut et le syndrome de Pearson caractérisé par la coexistence d'une atteinte des différentes lignées médullaires avec anémie sidéroblastique, d'une atteinte pancréatique et d'une acidose lactique, sont quant à eux des tableaux survenant essentiellement chez le nourrisson {DiMauro, 2004; McFarland, 2007; Schapira, 2006}.

3. Pathologies secondaires à une atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les études effectuées sur les mécanismes physiopathologiques des maladies mitochondriales ont permis de mettre en évidence le rôle d'un certain nombre de facteurs alimentaires, environnementaux et médicamenteux dans l'altération du bon fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Ces altérations peuvent être dues à une inhibition directe de l'un des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Parmi ceux-ci, le complexe I semble être un des plus fréquemment atteints ; les molécules responsables appartiennent à certaines grandes classes pharmacologiques telles que les neuroleptiques, les barbituriques, les antihypertenseurs de la sous-classe des inhibiteurs calciques et certains anesthésiques locaux comme la bupivacaïne. Les signes cliniques d'appel sont en premier lieu des atteintes neurologiques mais également un syndrome myopathique. Les antidiabétiques des sous-classes des biguanides et des thiazolidinediones semblent aussi avoir un impact sur le complexe I. Pour les biguanides, les

effets secondaires sont essentiellement une atteinte gastro-intestinale et une acidose lactique ; quant aux thiazolidinediones, elles impactent les systèmes hépatique et musculaire. Parmi les inhibiteurs du complexe I, on retrouve un insecticide, la roténone. De même, en ce qui concerne le complexe III, un des principaux inhibiteurs utilisés dans le domaine expérimental est un antibiotique utilisé comme fongicide et insecticide, l'antimycine A {Chan, 2005 ; Lagoutte , 2004}. Un poison bien connu du complexe IV est le cyanure. Enfin le valproate, antiépileptique, semble quant à lui interagir avec les complexes I et IV mais aussi dans la désorganisation de la membrane interne {Finsterer, 2012}.

Le deuxième mode d'action par lequel des molécules peuvent entraîner un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale est le découplage de la chaîne des oxydations phosphorylantes. Ces molécules sont des acides faibles interagissant avec les phospholipides de la membrane interne la rendant ainsi perméable aux protons. Elles comprennent des antiparkinsoniens (Tolcapone), des antiinflammatoires non-stéroïdiens (Diclofénac), des anesthésiques généraux (Propofol), des antidépresseurs inhibiteurs de la recapture sérotoninergique (Fluoxétine)... Les effets secondaires suspectés d'être en lien avec ce mode d'action sont divers : insuffisance hépatique fulminante (Tolcapone), acidose lactique (Propofol) ou atteinte cardio-vasculaire et extrapyramidale (Fluoxétine). Les chlorophénols utilisés comme bactéricides, fongicides et herbicides ainsi que le pentachlorophénol utilisé pour le traitement du bois ont également le même mécanisme de toxicité {Chan, 2005}.

L'augmentation du stress oxydant produit par la mitochondrie et l'entrée dans un "cercle vicieux" avec dommages oxydatifs des protéines et de l'ADN mitochondrial peut également être à l'origine de la toxicité de certaines molécules : la Doxorubine, anticancéreux intercalant connu pour sa cardiotoxicité, les fibrates , hypocholestérolémiants ayant une toxicité hépatique et musculaire et enfin l'Amiodarone, antiarythmique dont les effets secondaires sont hépatiques, pulmonaires et thyroïdiens {Chan, 2005}. L'alcool, quant à lui, est principalement métabolisé par la déshydrogénase alcoolique dont le co-facteur est le NADH ; il entraîne donc une diminution du pool de NAD⁺ cytosolique et mitochondrial imposant une pression à la chaîne respiratoire mitochondriale et une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène {Hoek, 2002}.

Le quatrième et dernier mode d'action toxique est l'inhibition de la réplication de l'ADN mitochondrial et de la synthèse protéique. Les antirétroviraux inhibiteurs de la transcriptase inverse (Zidovudine, Stavudine, etc...) utilisés dans le traitement du VIH sont capables d'inhiber l'ADN polymérase γ , enzyme clef de la réplication de l'ADN

« fibres COX negatives »

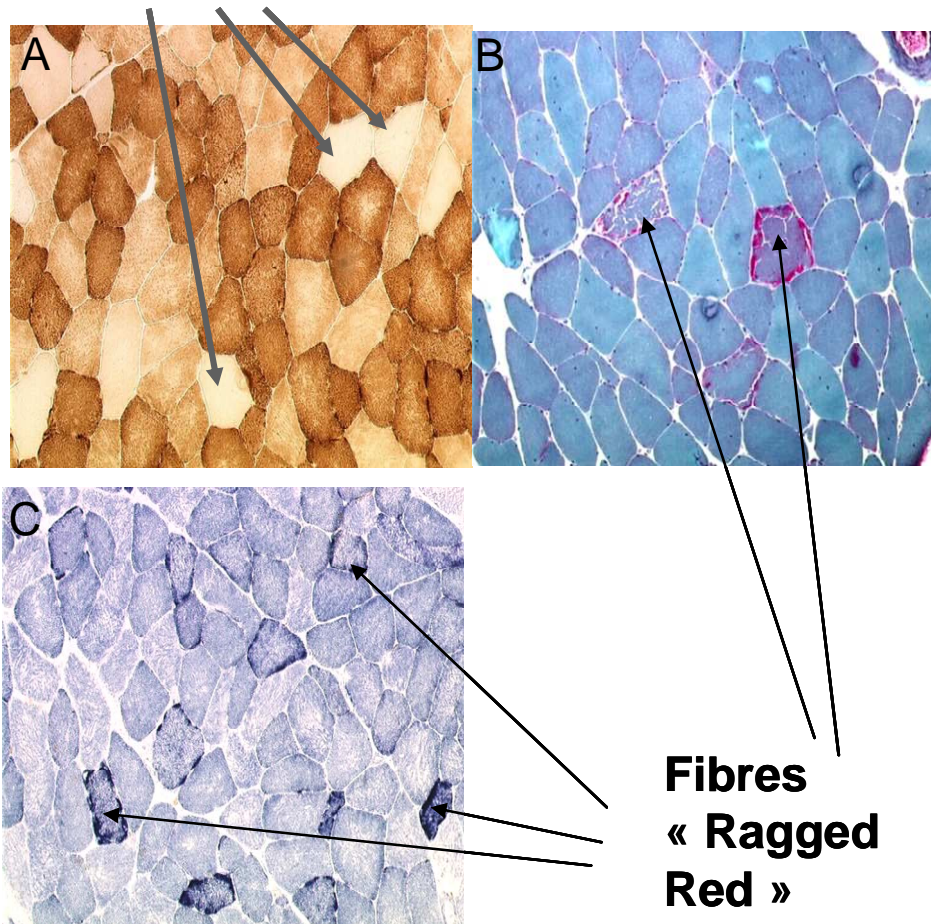


Figure 21 : anomalies histopathologiques musculaires rencontrées dans les maladies mitochondriales

Laboratoire d'anatomopathologie, Pitié-Salpêtrière

A) Cytochrome c oxydase

B) Trichrome de Gomori

C) Succinate déshydrogénase

mitochondrial, ce dernier codant pour treize sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les signes suspectés d'être associés à cette anomalie sont : neuropathie sensorielle, stéatose hépatique, hypertriglycémie, lipoatrophie et acidose lactique {Begriche, 2010; Vittecoq, 2002}. Enfin, les antibiotiques de la classe des oxazolidinones tels que le linézolide agissent en empêchant la fusion chez la bactérie des sous-unités 30S et 50S ; ils seraient également capables d'inhiber la traduction des protéines mitochondriales, une grande similarité existant entre les ribosomes bactériens et mitochondriaux. Leur toxicité s'exprime par une acidose lactique et une neuropathie périphérique {McKee, 2006 ; Soriano, 2005}.

La plupart des médicaments cités ci-dessus sont donc à éviter ou à proscrire en cas de maladie mitochondriale. Des cas d'aggravations ont par exemple été rapportés avec le valproate qui était utilisé pour le traitement de l'épilepsie présente dans plusieurs pathologies mitochondriales. Il a notamment entraîné des atteintes hépatiques irréversibles voire létales chez des patients présentant des syndromes d'Alpers-Huttenlocher (dont certains en lien avec une mutation sur le gène de l'ADN polymérase γ) mais également une aggravation des crises épileptiques chez des patients atteints de syndrome MELAS {Finsterer, 2012}.

4. Diagnostic

La première étape du diagnostic d'une maladie mitochondriale est l'analyse clinique comprenant l'âge de début, les symptômes et l'histoire familiale.

Cette dernière doit être complétée par des examens paracliniques orientés par la présentation clinique. L'imagerie cérébrale par résonance magnétique (IRM), souvent accompagnée de spectroscopie par résonance magnétique (spectro-RMN), est souvent pratiquée. Les signes considérés comme évocateurs de maladie mitochondriale à l'IRM sont des anomalies bilatérales et symétriques de la substance grise et du tronc cérébral, des atteintes des noyaux gris de la base du cerveau, des hypersignaux de la substance blanche, une atrophie cérébrale et/ou cérébelleuse et des calcifications cérébrales. A la spectro-RMN, le diagnostic peut être évoqué devant un pic élevé de lactate, parfois associé à une diminution du pic de N-acétylaspartate.

En parallèle de l'imagerie, un bilan métabolique doit être réalisé. Une hyperlactacidémie persistante ($>2,2\text{mM}$), une élévation du rapport lactate/pyruvate (>15), reflétant le statut redox cytoplasmique, et du rapport des corps cétoniques 3-hydroxybutyrate/acétoacétate (>2), reflétant le statut redox mitochondrial, font suspecter une maladie mitochondriale. Les dosages du lactate et du pyruvate peuvent également être effectués dans

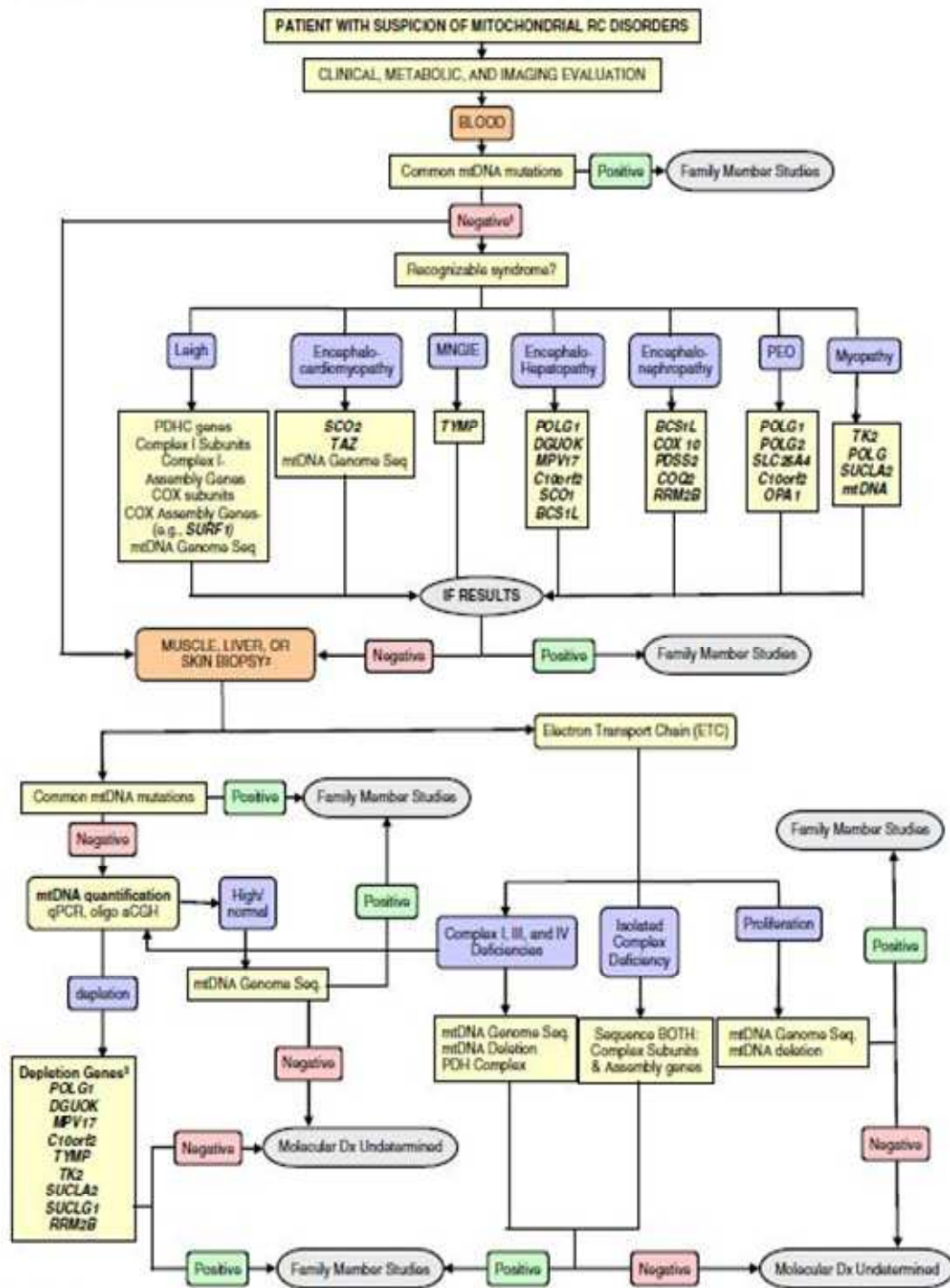


Figure 22 : Algorithme décisionnel pour le diagnostic moléculaire des patients suspects de maladie mitochondriale

L.J.Wong, Molecular genetics and metabolism, 2010

Oligo aCGH : oligonucléotide array comparative genomic hybridization

le LCR. L'excrétion urinaire de lactate, de dérivés intermédiaires du cycle de Krebs et/ ou de l'acide 3-méthylglutaconique est souvent observée par chromatographie mais n'est pas spécifique. La chromatographie des acides aminés plasmatiques met le plus souvent en évidence une augmentation de l'alanine, de la proline et parfois de la méthionine. D'autres anomalies biologiques peuvent être associées comme une élévation des CPK, une élévation des transaminases...

L'exploration doit être poursuivie si possible sur un tissu cliniquement atteint (muscle, foie, rein, coeur...). L'examen histologique de la biopsie musculaire peut orienter le diagnostic en présence de surcharge lipidique, d'agrégats sous-sarcolemnaux, de fibres COX négatives, de Ragged-Red Fibers (accumulation de mitochondries anormales péri et intermyofibrillaires, Figure 21).

L'exploration de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale peut se faire par analyses spectrophotométriques ou polarographiques. La spectrophotométrie permet de mesurer l'activité des complexes isolés ou combinés. Elle peut se pratiquer sur tissus frais ou congelés. La polarographie se fait quant à elle uniquement sur tissu frais et permet de mesurer la consommation en oxygène en présence de différents substrats grâce à une microélectrode d'or ou de platine. Les déficits peuvent être isolés ou combinés. Le déficit en complexe I est le plus fréquemment observé ; on le retrouve chez 30% des patients {Chabrol, 2011}. Une activité préservée de la chaîne respiratoire mitochondriale sur un tissu ne permet pas d'exclure une pathologie mitochondriale car, comme nous l'avons vu précédemment, l'hétérogénéité de distribution tissulaire de certaines mutations de l'ADN mitochondrial peut entraîner de nettes différences d'expression entre les tissus {Chabrol, 2011; Munnich, 2001}. A contrario, une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire ne signifie pas forcément l'existence d'une maladie mitochondriale car il existe des déficits secondaires (déficit en PDH, cash syndrome, inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse,...).

L'exploration génétique peut être débutée sur le sang par la recherche des mutations ponctuelles de l'ADN mitochondrial les plus courantes comme celles à l'origine des syndromes LHON, MELAS ou MERRF. La recherche de mutations sur des gènes candidats est possible si les signes cliniques ou les syndromes observés correspondent à un nombre restreint de gènes candidats. Les altérations de l'ADNmt peuvent être absentes dans l'ADN extrait du sang mais présentes dans un autre tissu. Il est donc important de les rechercher dans l'ADN extrait d'un tissu cliniquement atteint (Figure 22) {Wong, 2010}.

L'approche diagnostique des maladies mitochondriales est en constante évolution du fait de la progression des connaissances mais aussi à cause de l'apparition de nouvelles

techniques. La technologie NGS (Next Generation Sequencing ou séquençage à haut débit) est en pleine expansion. Plusieurs méthodes existent mais elles comprennent toutes une étape d'amplification de l'ADN cible et une étape de séquençage avec incorporation de nucléotides dans la chambre de réaction, lavage de la chambre de réaction et capture de l'image.

Les approches sont soit le séquençage de la totalité de l'exome (WES pour Whole Exome Sequencing) chez un patient soit le séquençage de plusieurs gènes cibles chez plusieurs patients à la fois. Le WES a permis de mettre en évidence de nouveaux gènes responsables de pathologies mitochondriales. Toutefois de nombreux variants identifiés restent de signification clinique difficile à établir. Il est actuellement difficile de savoir l'efficacité réelle de cette approche dans la mesure où seuls les succès sont publiés.

L'approche par séquençage d'un panel ciblé de gènes est intéressante car elle permet d'analyser les principaux gènes candidats d'une pathologie chez plusieurs patients à la fois. Les panels peuvent être construits en fonction de la pathologie (myopathie, syndrome de Leigh), en fonction d'un déficit de la chaîne respiratoire (déficit en complexe I, déficit en complexe III...)... Un seul centre diagnostique n'ayant pas un recrutement suffisant de patients, cette stratégie doit se faire dans le cadre de collaborations en réseau.

Le séquençage systématique de la totalité de l'ADN mitochondrial apparaît nécessaire non seulement chez l'adulte mais également chez l'enfant comme l'a montré une étude française multicentrique récente {Bannwarth, 2013}. Là encore une difficulté importante réside dans l'appréciation du caractère délétère des nombreux variants identifiés {Wong, 2013; Wong, 2010 ; Carroll, 2013 ; Atwal, 2014}.

5. Traitement

Le traitement des maladies mitochondriales est un réel défi en raison de leur diversité et de l'extrême variabilité de leur expression clinique et biochimique. Il reste à ce jour essentiellement symptomatique. Les approches thérapeutiques utilisées aujourd'hui, qui visent à « contourner » les effets du ou des blocs métaboliques ont une efficacité très limitée {Aubourg, 1999}.

En ce qui concerne les mesures nutritionnelles, le jeûne prolongé et, à l'inverse, un apport massif de glucose sont déconseillés. Un régime cétogène peut être recommandé notamment en cas de déficit en complexe I associé à une hyperlactacidémie. Ce régime consiste en un apport nutritionnel riche en graisses et faible en carbohydrates et permet ainsi de créer une cétose alors que le sujet reçoit un apport énergétique suffisant. Ce n'est alors plus

le glucose qui fournit l'énergie aux différentes cellules, mais les corps cétoniques ; acétone, acétoacétate et le 3 hydroxypyruvate.

Il a tout d'abord été utilisé dans le traitement des épilepsies pharmacorésistantes mais il est aujourd'hui conseillé dans de nombreux troubles neurologiques dont ceux en lien avec une pathologie mitochondriale. Des études ont d'ailleurs montré que la respiration mitochondriale ainsi que les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont augmentées chez des animaux sous régime cétogène {Tieu, 2003}. Son efficacité reste toutefois sujet à controverse car les lipides utilisent aussi le complexe I dans leur catabolisme {Chabrol, 2011}. De plus ce régime fait souvent l'objet d'une mauvaise compliance en raison de son manque de flexibilité et il peut avoir des effets néfastes à long terme comme une augmentation du cholestérol et des triglycérides chez l'adulte ou un retard de croissance chez l'enfant. Des régimes alternatifs commencent donc à lui être substitué tels que le régime à base de triglycérides à chaîne moyenne, le régime Atkins modifié ou encore le régime à faible indice glycémique {Gano, 2014}.

L'apport de coenzyme Q 10 a montré une efficacité pour les déficits primaires de la biosynthèse du coenzyme Q mais s'est révélé peu efficace pour les autres déficits de la chaîne respiratoire mitochondriale comme l'a par exemple montré l'étude Glover en 2010 {Glover, 2010 ; Pfeffer, 2012}.

Diverses autres molécules ont été testées au cours de ces 20 dernières années : créatine, dichloroacétate, acide lipoïque, diméthylglycine, L-arginine...Le dichloroacétate réduit les taux de lactate et de pyruvate comme on pouvait s'y attendre pour un activateur de la pyruvate déshydrogénase. Son utilisation thérapeutique a dû être arrêtée du fait d'une toxicité sur les nerfs périphériques {Kaufmann, 2006}. La L-arginine a été utilisée dans la prévention des épisodes « stroke-like » du MELAS du fait de son action sur la microvascularisation cérébrale {Koga, 2005}. Son efficacité et son innocuité restent à démontrer. Une substitution enzymatique a été testée dans le syndrome MNGIE pour restaurer l'activité thymidine phosphorylase par l'administration répétée de plaquettes ou de thymidine phosphorylase encapsulée dans des globules rouges. Elle s'est avérée efficace mais uniquement de façon transitoire {Lara, 2006; Moran, 2008}. La greffe de moelle osseuse a permis de stabiliser les patients mais elle est grevée d'un très grand risque dû notamment à la grande dénutrition des patients dont plusieurs sont décédés au décours rapide de la greffe {Chabrol, 2011}.

Les approches symptomatiques palliatives sont nombreuses et souvent efficaces. La pose d'un pacemaker pour un trouble de la conduction auriculo-ventriculaire (par exemple

dans un syndrome de Kearns-Sayre) a fait la démonstration de son efficacité. Elles sont toutefois rarement dépourvues de risque et d'effet secondaire. C'est le cas de la correction chirurgicale d'un ptosis (avec l'existence d'un risque de kératite à répétition par défaut d'occlusion des yeux) et des transplantations (cardiaque, rénale, de moelle osseuse, de foie selon l'atteinte tissulaire) avec les risques inhérents de rejet ou d'infections liées à l'administration du traitement immunosuppresseur.

La thérapie génique a pour but l'introduction chez un patient de la copie normale du gène déficient responsable de la maladie, ou la modification de l'expression du ou des gènes délétères. Une thérapie génique serait par exemple envisageable dans les cas de mutations des gènes d'ARN de transfert s'il était possible de délivrer des ARNt non-mutés dans l'organe. La voie d'importation d'ARNt du cytosol vers la mitochondrie semble offrir une telle possibilité. Une étude a été récemment publiée à ce sujet sur l'ARNt de la lysine {Gowher, 2013}. Le problème majeur est la nécessité de correction des différents tissus affectés par le déficit mitochondrial. Il est donc probable que les succès seront observés dans les maladies à expression très restreinte (atteintes oculaires isolées par exemple) ou dans les maladies par surcharge comme le déficit en *TYMP* dans lesquelles la restauration d'une faible activité résiduelle devrait modifier considérablement la maladie.

6. Conseil génétique

Les maladies mitochondriales suivent soit les lois de l'hérédité maternelle soit celles de l'hérédité mendélienne selon la localisation des mutations causales sur le génome mitochondrial ou nucléaire. En outre un nombre non négligeable d'altérations de l'ADN mitochondrial sont sporadiques, c'est le cas notamment de la quasi-totalité des délétions uniques.

Si l'anomalie génétique causale est identifiée et nucléaire, le diagnostic anténatal est possible sur villosités chorioniques à 11 semaines d'aménorrhée.

Le diagnostic prénatal reste par contre compliqué pour les anomalies de l'ADNmt dans la mesure où il est difficile d'évaluer l'évolution des proportions de copies d'ADN mitochondrial normal et muté au cours de la vie. L'évolution au cours de la gestation semble quant à elle assez stable {Monnot, 2011}. Les recommandations actuelles sont résumées dans le paragraphe suivant {Chabrol, 2011; Holt, 2003}.

Si une mutation ponctuelle hétéroplasmique est absente dans différents tissus de la mère du cas index, le risque de transmission est très faible. Un dépistage est alors proposé à 16 semaines d'aménorrhée sur liquide amniotique. Par contre le risque de transmission est

élevé si la mutation est présente dans les leucocytes maternels. Il peut être alors proposé un dépistage à 11, 16 et 20 semaines d'aménorrhée pour voir l'évolution des taux d'hétéroplasmie. On considère qu'un taux inférieur à 20 % est de bon pronostic et qu'un taux supérieur à 80% est au contraire de mauvais pronostic. Il reste évidemment une grande zone d'hétéroplasmie où le risque ne peut être déterminé. Les enfants nés après un tel diagnostic anténatal sont très peu nombreux et leur devenir est trop court pour que l'on puisse avoir une idée précise de l'efficacité de la prédiction. Dans le cas d'une mutation homoplasmique, le verdict reste très incertain car de nombreux facteurs encore inconnus sont impliqués dans l'expression de la maladie {Chabrol, 2011; Holt, 2003}. Le diagnostic pré-implantatoire est une alternative mais il ne s'applique en pratique qu'à certaines mutations (associées à une probabilité suffisante de trouver des ovules non mutés).

II. Projet de thèse et objectif

Comme nous l'avons vu précédemment, les maladies mitochondriales représentent un ensemble très divers de pathologies en lien avec une atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale. Au cours de mon travail de thèse, j'ai abordé la complexité de ces maladies dans deux situations différentes : l'investigation à partir d'un déficit enzymatique et l'analyse des relations génotype/phénotype dans une cohorte de patients atteints porteurs de mutations d'un même gène nucléaire.

Dans la première partie du travail, j'ai étudié des déficits en complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces déficits sont les moins nombreux des déficits respiratoires rencontrés chez l'homme et sont encore relativement peu étudiés. Mon projet vise à établir le profil des altérations moléculaires et cellulaires de ces déficits à la recherche de lien physiopathologique entre ces altérations et les maladies qui leur sont associées. Pour ce travail, nous avons disposé des fibroblastes de 15 patients pour lesquels un déficit en complexe III avait été préalablement identifié dans le muscle, le foie, ou les lymphocytes et dont les fibroblastes exprimaient un déficit respiratoire. Ce travail nous a permis d'identifier deux causes nouvelles de déficit en complexe III et de montrer la grande hétérogénéité, moléculaire et cellulaire, des déficits en complexe III.

Dans la deuxième partie du travail, j'ai étudié une cohorte de patients porteurs de mutations du gène *POLG* codant l'ADN polymérase γ . Les mutations du gène *POLG* ont été proposées comme une des causes les plus fréquentes de maladie mitochondriale, responsables d'atteintes très diverses, essentiellement neurologiques ou neuro-musculaires, souvent décrites sous forme de syndromes. Nous avons tenté de définir la présentation clinique et les altérations mitochondriales des patients porteurs de mutations du gène *POLG* en comparant 154 patients dont le gène *POLG* avait été séquencé au sein du laboratoire de diagnostic de la Pitié-Salpêtrière. Parmi ces patients, 34 avaient un gène *POLG* muté sur les deux allèles, 10 sur un seul allèle et 110 présentaient une séquence normale. Au travers de ce travail nous montrons que les mutations du gène *POLG* sont responsables de tableaux cliniques reproductibles dont l'hétérogénéité est relativement réduite une fois que l'histoire naturelle de la maladie est prise en compte. Cette reconnaissance des signes caractéristiques des mutations de *POLG* permet donc d'avancer dans la compréhension de la physiopathologie et, en pratique, de réduire les indications de l'analyse de ce gène relativement grand (22 exons codants) dont le séquençage représente un investissement non négligeable.

Chez les mammifères

Nom commun	Sous-unité (mammifère)	Gène (mammifère)	S cerevisiae Nom/Gène	acides aminés	PM (kDa)	Fonction
Core 1	1	<i>UQCRC1</i>	Qcr1 (<i>COR1</i>)	480	52.6	Liaison de Rieske
Core 2	2	<i>UQCRC2</i>	Qcr2 (<i>COR2</i>)	453	48.4	Assemblage du complexe
Cytochrome b	3	<i>MT-CYB</i>	Qcr3 (<i>COB</i>)	380	42.7	Transfert des électrons
Cytochrome c1	4	<i>CYC1</i>	Qcr4 (<i>CYT1</i>)	325	35.4	Transfert des électrons
Protéine Rieske	5	<i>UQCRFS1</i>	Qcr5 (<i>RIP1</i>)	247	29.7	Transfert des électrons
Protéine Hinge	6	<i>UQCRH</i>	Qcr6 (<i>QCR6</i>)	91	11	Liaison des cytochromes c1 et c
/	7	<i>UQCRB</i>	Qcr7 (<i>QCR7</i>)	111	14	Couplage transfert e ⁻ /pompage H ⁺
QP-C	8	<i>UQCRQ</i>	Qcr8 (<i>QCR8</i>)	82	9.5	Liaison du cytochrome b
/	9	<i>UQCR10</i>	Qcr9 (<i>QCR9</i>)	63	7.2	Interaction avec cytochrome c1
/	10	<i>UQCR11</i>	Qcr10 (<i>QCR10</i>)	56	6.4	Liaison de Rieske
Pré-séquence Rieske	11	<i>UQCRFS1</i>	/	78	8	/

Tableau 3 : Sous-unités du complexe III
D'après www.uniprot.org

III. Etude des déficits du complexe III

A. Introduction

1. Le complexe III (ubiquinol cytochrome *c* oxydoréductase)

Le complexe III ou ubiquinol-cytochrome *c* oxydo-réductase joue un rôle central dans la chaîne respiratoire mitochondriale puisqu'il est le point de convergence des électrons à partir de nombreuses sources dont les complexes I et II mais aussi l'ETF déshydrogénase et la glycérol phosphate déshydrogénase.

a) Composition

Il s'agit d'un complexe hétéropolymérique de 248 kDa et 2165 acides aminés, présent à l'état physiologique sous forme le plus souvent homodimérique.

Chez les mammifères, chaque monomère est constitué de 11 sous-unités différentes dont le rôle, la composition, la masse moléculaire et l'homologue chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont répertoriés dans le tableau 3 {Yu, 1999 ; Smith, 2012}. Seules trois de ces sous-unités sont dites catalytiques car elles participent au transfert des électrons, il s'agit du cytochrome *b*, du cytochrome *c*1 et de la protéine Rieske. Les sous-unités « core » appartiennent à la famille des MPP (Mitochondrial Processing Peptidases). Elles possèdent une activité peptidase inhibée en cas d'assemblage du complexe, suggérant un rôle dans l'import des protéines à la mitochondrie {Deng, 1998}. Parmi ces sous-unités le cytochrome *b* est codé par l'ADN mitochondrial et les 10 autres sous-unités sont codées par l'ADN nucléaire.

b) Structure

La structure du complexe III de mitochondries de cœur de bœuf a été étudiée par cristallographie dans différentes études. Cette technique implique tout d'abord l'utilisation de détergent pour l'extraction des complexes de la membrane interne et leur maintien dans une forme soluble en solution aqueuse. Comme de nombreux composés, la protéine peut être cristallisée à mesure qu'elle devient sursaturée en solution aqueuse. Le procédé de cristallisation est souvent initié par l'addition de divers agents de précipitation, y compris des sels tels que NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, des polymères comme le polyéthylène glycol, et/ou une

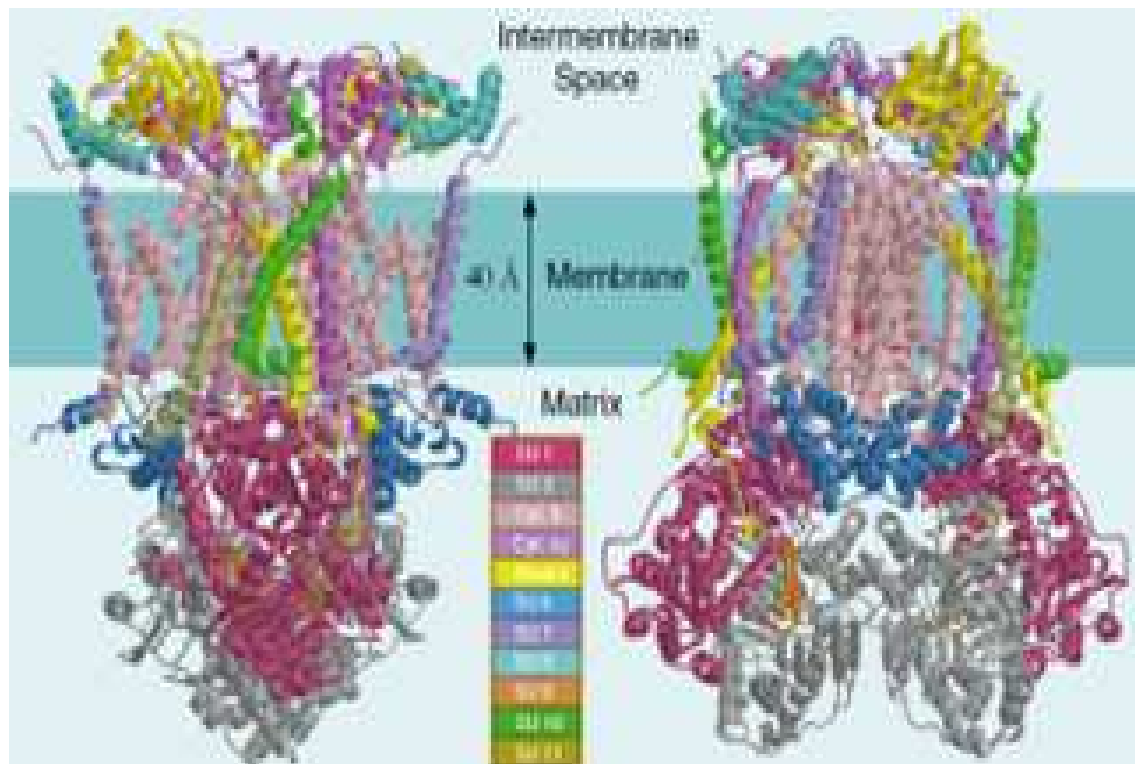


Figure 23 : Complexe bc1 de vertébré

E.Berry, Annu Rev Biochem, 2000

Les 2 images diffèrent de 90° perpendiculairement par rapport à la membrane

Fushia : sous-unité 1

Gris : sous-unité 2

Beige : cytochrome b

Violet : cytochrome c1

Jaune : protéine Rieske

Bleu : sous-unité 6

Mauve : sous-unité 7

Bleu ciel : sous-unité 8

Orange : sous-unité 9

Vert : sous-unité 10

Kaki : sous-unité 11

variété de molécules organiques comme l'éthanol, l'isopropanol, et le 2-méthyl-2,4-pentanediol. Ces agents de précipitation permettent de réduire la solubilité des molécules. Le procédé de cristallisation de protéines est souvent dépendant du pH et de la température. Lorsque les molécules contenues dans le cristal sont placées dans un faisceau de rayons X, il y a interférence et amplification des rayonnements réémis par leurs électrons : c'est le phénomène de diffraction. La structure de ces cristaux en 3D peut alors être déterminée avec une résolution avoisinant les 3 Å pour les études sur le complexe III citées ci-après {Bolla, 2012 ; Iwata, 1998; Xia, 1997; Yu, 1999; Zhang, 1998}.

Le complexe III peut être divisé en trois régions :

- la région matricielle représente plus de la moitié de la masse moléculaire du complexe. Elle s'étend à 75 Å de l'hélice transmembranaire. Elle comprend les sous-unités 1, 2, 6, 9, une partie de la sous-unité 7, la partie C-terminale du cytochrome *c*1 et la partie N-terminale d'ISP (Iron Sulfur Protein).
- La région transmembranaire mesure environ 40 Å. Chaque monomère comprend treize hélices : huit du cytochrome b, les cinq restantes appartenant au cytochrome *c*1, à ISP et aux sous-unités 7, 10 et 11. Cette région abrite les centres héminiques *b_L* et *b_H* du cytochrome b ainsi que les sites *Q_o* et *Q_i* que nous verrons ultérieurement.
- Et enfin la région intermembranaire s'étend jusqu'à 38 Å de la membrane interne. Elle abrite des domaines fonctionnels du cytochrome *c*1, d'ISP ainsi que la sous-unité 8. Le domaine extra-membranaire d'ISP d'un monomère est connecté avec le domaine opposé de l'autre monomère.

La hauteur du complexe est donc d'environ 155 Å et sa largeur de 130 Å (Figure 23).

Trois éléments se sont avérés importants pour la fonction du complexe : la mobilité du domaine extra-membranaire de la protéine de Rieske (ou protéine Fer-Soufre ou ISP) pendant la catalyse, l'interaction entre les deux monomères tête-bêche et l'inhibition de l'activité MPP par la liaison de la sous-unité 9 au niveau du site actif {Berry, 2000; Yu, 1999}.

Le domaine extra-membranaire de la protéine de Rieske a en effet été trouvé à deux positions différentes dans les structures cristallines de cytochrome bc1 de poulet {Zhang, 1998}. Une position b liait le site *Q_o* du cytochrome b et une position c1 était proche de l'hème c1. Pendant le cycle catalytique du cytochrome bc1 que nous verrons ultérieurement, les mouvements de la tête d'ISP entre ses positions b et c1 permettent le transfert d'électrons à partir de *Q_o* jusqu'à l'hème c1 {Darrouzet, 2001}.

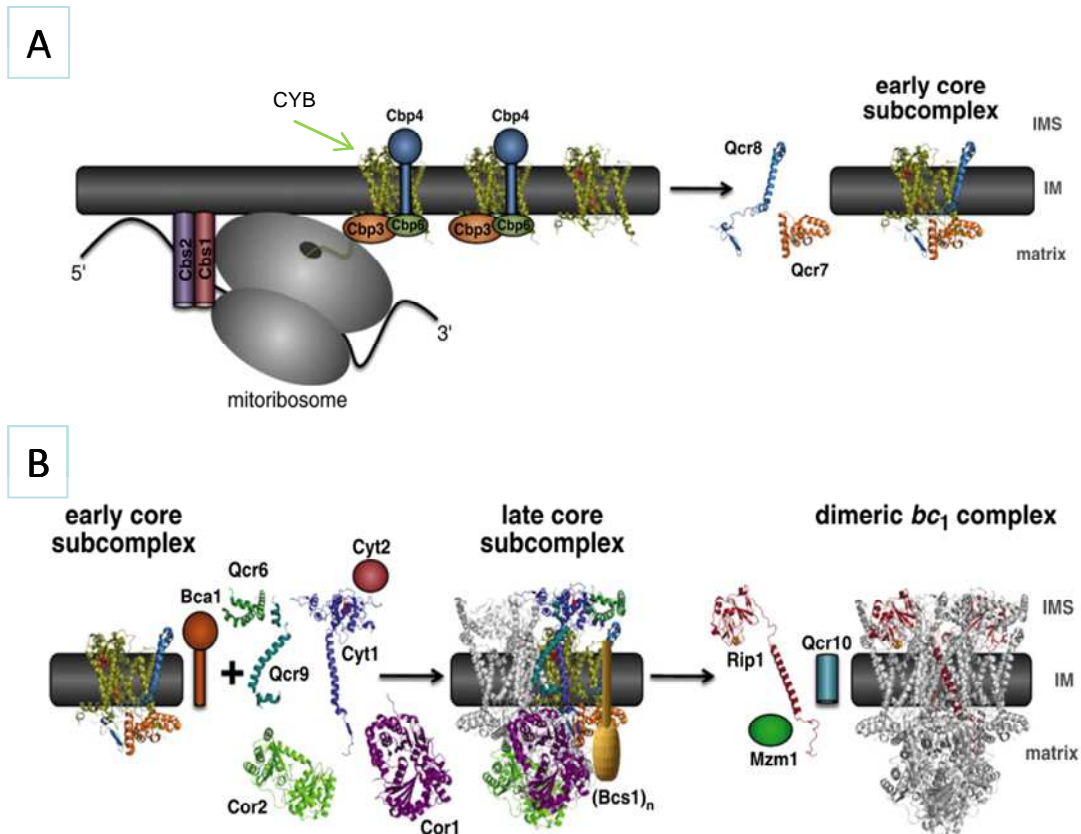


Figure 24 : Assemblage du complexe bc1 chez la levure

P.Smith, BBA, 2012

A : sous-complexe précoce

B : sous-complexe tardif et dimérisation

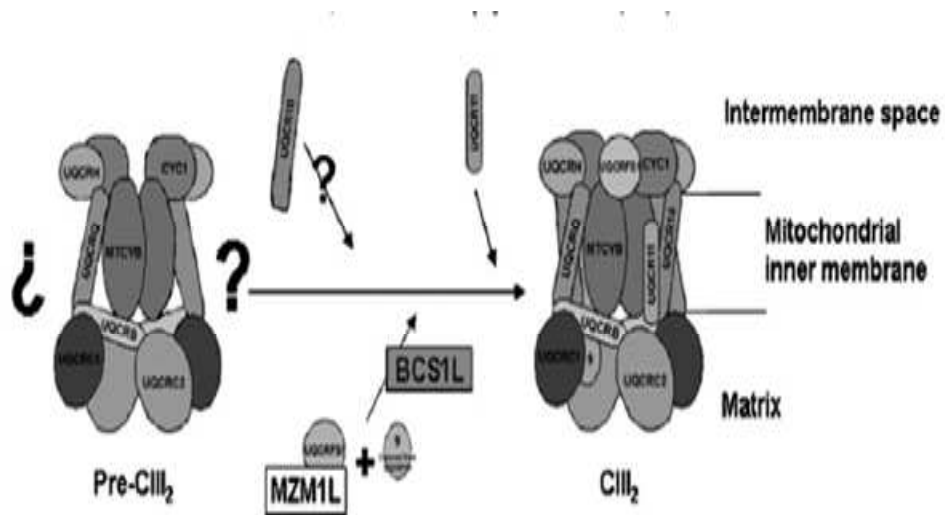


Figure 25 : Assemblage du complexe bc1 chez les mammifères

E.Sanchez, BBA, 2013

c) Assemblage

(1) Description

Le modèle d'assemblage du complexe III a été établi par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en 2 dimensions {Zara, 2009}. L'assemblage est présenté chez la levure sur la Figure 24.

L'unité d'ancrage est constituée par le cytochrome b, sur lequel viennent tout d'abord se fixer les sous-unités Qcr7 et Qcr8 (soit UQCRB et UQCRQ chez le mammifère). Le cytochrome c1 s'associe avec core 1 ou core 2 indifféremment. Cette association est ensuite incorporée dans le complexe III natif. Cette association reste inexpliquée puisqu'au sein du complexe bc₁ complet, le cytochrome c1 est spatialement éloigné de core 1 et core 2. L'implication biologique de cette association initiale reste donc inconnue.

L'intermédiaire tardif d'assemblage (« late core subcomplex ») comprend le noyau central (soit cyt b, Qcr7 et Qcr8), le cytochrome c1, core 1, core 2 ainsi que Qcr6 (UQCRH chez le mammifère) et Qcr9 (UQCR10 chez le mammifère) qui semblent nécessaires à l'intégration de l'ISP. Le facteur d'assemblage BCS1, également nécessaire pour l'incorporation d'ISP, est aussi présent dans ce sous-complexe. Qcr9 et BCS1 ont des rôles différents puisqu'aucune ne peut pallier l'absence de l'autre. BCS1 jouerait un rôle de translocase. Qcr9 serait, quant à elle, associée par son hélice transmembranaire à l'hélice transmembranaire de Rip1 (ou ISP) dans un même monomère.

Les dernières sous-unités à être incorporées dans un monomère sont donc Rip1 et Qcr10 (UQCR11 chez le mammifère). Qcr 10 protégerait Rip1 libre de l'hydrolyse.

L'assemblage se termine par l'homodimérisation du complexe. Chaque sous-unité Rip1 a son domaine globulaire dans un monomère et son hélice transmembranaire dans le monomère adjacent. Seuls les complexes dimérisés peuvent être inclus dans des supercomplexes {Smith, 2012}.

(2) Facteurs d'assemblage du complexe bc1

De nombreux facteurs sont connus chez la levure {Smith, 2012}. Ils sont listés ci-après. Seuls trois facteurs ont des homologues humains et sont décrits plus en détails.

- Cbs 1 : activateur de la traduction de l'ARNm COB,
- Cbs 2 : activateur de la traduction de l'ARNm COB,

- Cbp 1 : activateur de la traduction de l'ARNm COB,
- Cbp 2 : facteur d'épissage du pré-ARNm de COB,
- Cbp 3 : activateur de la traduction de l'ARNm COB, interagit également avec le cytochrome b nouvellement synthétisé,
- Cbp 4 : interagit avec le cytochrome b nouvellement synthétisé,
- Cbp 6 : activateur de la traduction de l'ARNm COB, interagit également avec le cytochrome b nouvellement synthétisé,
- Cyt 2 : lyase impliquée dans la maturation du cytochrome c1,
- Cyc 2 : protéine de l'espace intermembranaire impliquée dans la maturation des cytochromes c et c1,
- Bca 1 : protéine de la membrane interne impliquée dans l'étape précoce d'assemblage du complexe chez les champignons.
- Bcs1 est le facteur d'assemblage le plus connu car impliqué depuis plus de 10 ans dans des maladies humaines. C'est une protéine de la famille des AAA-ATPase. Il est nécessaire à l'incorporation de la protéine Rip 1 dans le complexe bc1. Il est transloqué de la matrice vers la membrane interne. Son homologue chez l'homme est BCS1L, protéine de 47,5 kDa. Ce facteur a été impliqué dans plusieurs cas de pathologie humaine que nous verrons ultérieurement {de Lonlay, 2001; Fernandez-Vizarra, 2007; Hinson, 2007}.
- TTC19 (Tetracopeptide repeat domain 19) a été plus récemment caractérisé. Il est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 43 kDa qui est importé dans le compartiment mitochondrial via un mécanisme potentiel-dépendant. La protéine mature est de 35 kDa. Il joue un rôle précoce dans l'assemblage du complexe mais le mécanisme d'action reste encore incertain ; il agit probablement comme une protéine chaperon {Ghezzi, 2011}.
- Mzm1 est une protéine de la famille des protéines à motif N-terminal LYR. Chez la levure, il a été montré qu'un déficit entraînait un défaut de maturation et une activité réduite du complexe III. Il agit en stabilisant Rip1 lui conférant une protection contre la dégradation protéolytique et l'agrégation (Figure 25). Son homologue chez l'homme vient d'être décrit et impliqué dans un déficit humain. Il s'agit de LYRM7, protéine de 12 kDa. L'expression de LYRM7 chez des levures dépourvues de Mzm1 permet de restaurer l'activité respiratoire {Sanchez, 2013}.

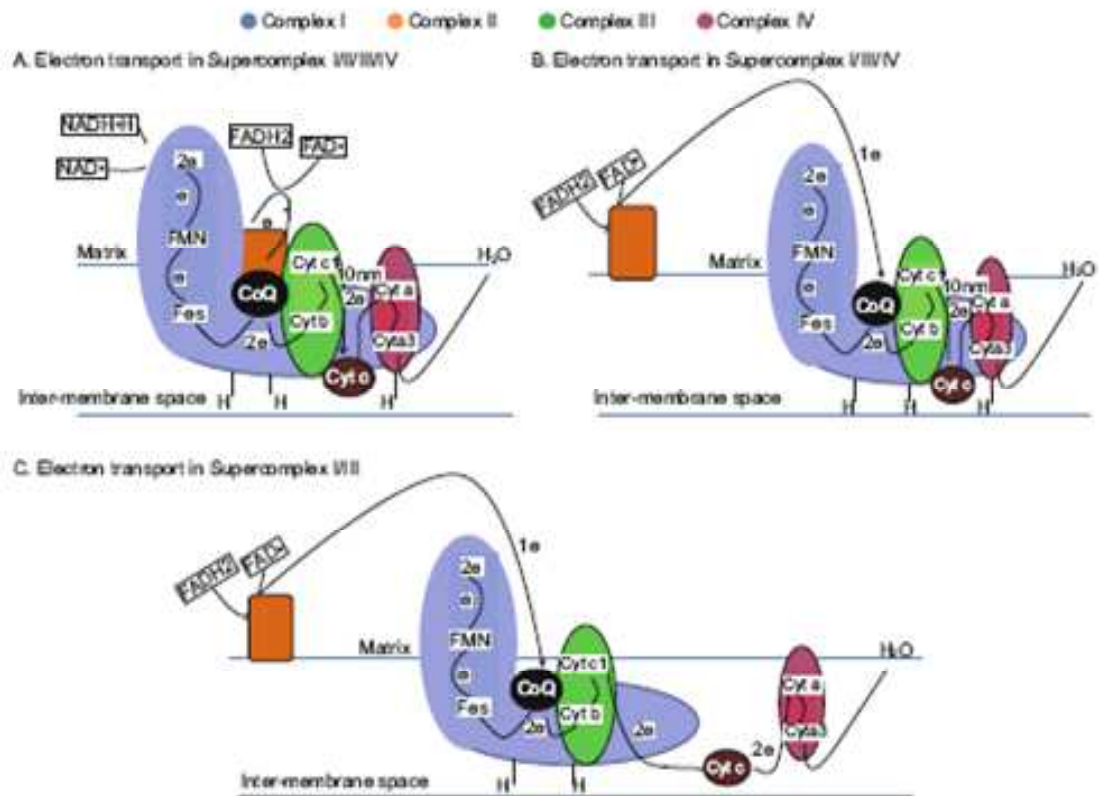


Figure 26 : Quelques exemples de supercomplexes
 Vartak, *Protein Cell*, 2013

d) Implication du complexe III dans les supercomplexes respiratoires

Au-delà de son assemblage et de son homodimérisation, le complexe III peut également s'associer avec d'autres complexes de la chaîne respiratoire pour former des supercomplexes appelés respirasomes.

Deux modèles sont longtemps restés opposés. Chance et William ont été les premiers à proposer un modèle « solide » en 1955 au sein duquel les complexes existaient comme une simple entité respiratoire {Vartak, 2013}. A l'inverse, dans le modèle « fluide », les complexes migrent au sein de la membrane interne et le flux des électrons entre ces différents complexes se fait grâce à des transporteurs mobiles comme le coenzyme Q ou le cytochrome *c*. Ce dernier modèle n'avait cessé de prendre de l'importance depuis 1986 du fait de données issues de modèles cinétiques et de la démonstration que les complexes pouvaient être purifiés individuellement {Hackenbrock, 1986}.

Au début des années 2000, différentes études ont remis en avant le modèle « solide » notamment par l'observation de la co-migration de certains complexes en Blue Native Page et lors de centrifugation en gradient de densité. Schagger en 2000 a montré la présence de supercomplexes contenant les complexes I, III et IV dans des mitochondries bovines, le complexe I n'existant quasiment jamais de façon isolée. Les complexes les plus fréquemment retrouvés sont I/III_n, I/III_n/IV_n et III/IV_n {Schagger, 2000}. Le complexe II est quant à lui presque toujours isolé. Il peut cependant être parfois associé avec le supercomplexe I/III/IV. Le complexe V dimérique co-migre avec certains supercomplexes mais en fait rarement partie (Figure 26) {Vartak, 2013}.

L'importance fonctionnelle de ces supercomplexes reste encore débattue. Acin-Perez et al ont montré grâce à une électrode de type Clark que les supercomplexes I/II/III/IV et I/III/IV isolés pouvaient respirer individuellement {Acin-Perez, 2008}. L'association en supercomplexes aurait un intérêt cinétique ; par exemple l'association I/III permet d'augmenter la cinétique d'activité de la NADH cytochrome *c* réductase {Genova, 2008}. Enfin l'existence de ces supercomplexes pourrait également jouer un rôle dans l'assemblage et la stabilité des complexes. Le complexe III semble notamment intervenir dans la stabilité du complexe I puisqu'il permet d'améliorer la stabilité et de restaurer une activité partielle du complexe I dans des tissus de souris KO pour NDUF54, petite sous-unité du complexe I importante pour l'assemblage de celui-ci {Calvaruso, 2012}.

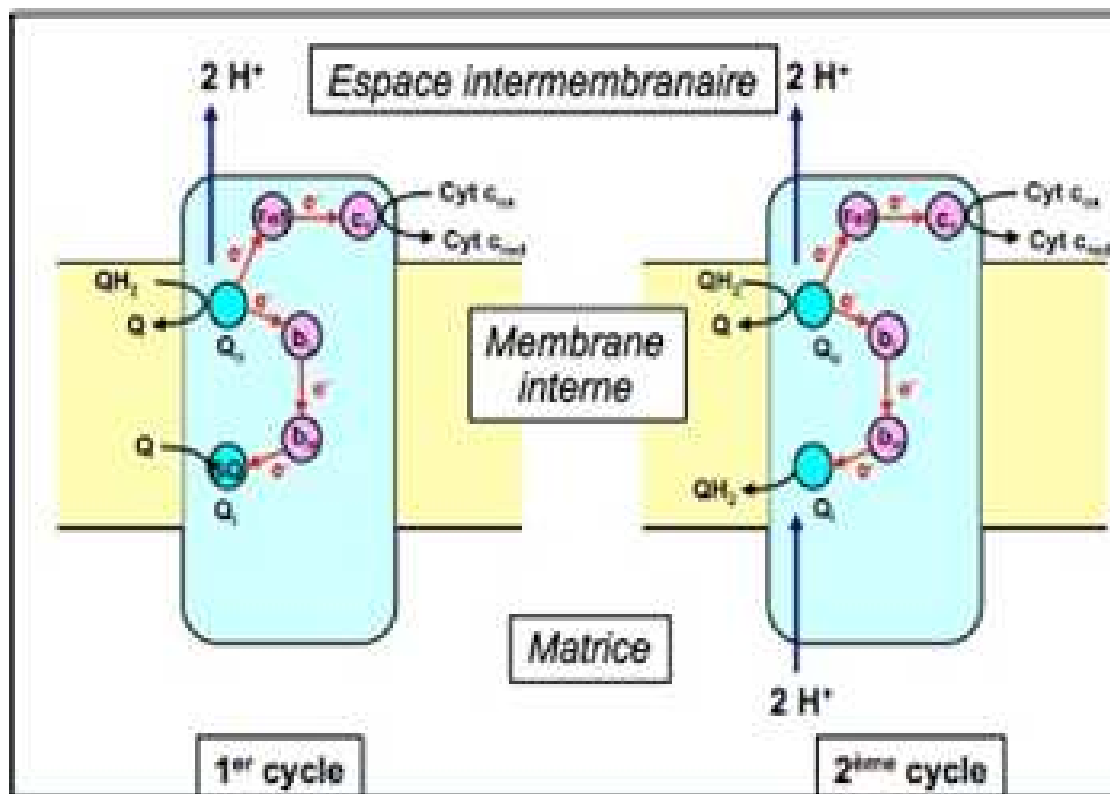


Figure 27 : Cycle Q
 J-P.Mazat, Médecine Sciences, 2010
 QH_2 : ubiquinol
 Q : ubiquinone
 SQ : semiubiquinone
 $Cyt\ c$: cytochrome c

L'organisation structurale de la chaîne respiratoire mitochondriale est certainement bien plus riche et complexe que celle proposée par les deux modèles et il existe certainement une variété de structures alternatives.

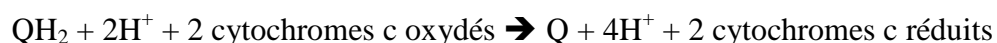
e) Fonction du complexe III

Le complexe III catalyse le transfert d'électrons de l'ubiquinol vers le cytochrome *c*. Le mécanisme par lequel il associe transfert d'électrons et flux de protons est appelé cycle Q (Figure 27) {Mitchell, 1976}.

L'existence de deux sites actifs est une caractéristique essentielle du mécanisme du cycle Q proposé par Mitchell. Elle a été mise en évidence par l'existence de différents inhibiteurs se liant à des sites distincts et donc capables d'inhiber des étapes différentes du cycle. La présence de deux sites actifs a été confirmée par différentes structures cristallines. Le site Q_o (out) est situé près de la face cytoplasmique de la membrane mitochondriale interne et le site Q_i (in) est du côté de la face matricielle de la membrane interne. Les deux hèmes du cytochrome *b* ont, quant à eux, différents potentiels redox. Le site Q_o est proche de b_L (faible potentiel) et le site Q_i est proche de b_H (fort potentiel) {Saraste, 1999}.

Le cycle Q comprend plusieurs étapes : une molécule d'ubiquinol(QH_2) se fixe au site Q_o . Il est oxydé en ubiquinone (Q) et libère ses deux protons dans l'espace intermembranaire tout en transférant deux électrons au cytochrome *b*. L'un de ces électrons gagne directement le cytochrome *c* via la protéine Fe-S et le cytochrome *c*1. L'autre électron passe par les cytochromes b_L et b_H du cytochrome *b* puis atteint le site Q_i où il réduit partiellement une molécule d'ubiquinone en semi-ubiquinone (SQ). Cette semi-ubiquinone est une source importante de production d'ERO, d'autant plus lorsque le complexe III fonctionne de façon ralentie. Sa réduction complète en ubiquinol doit en effet attendre qu'une deuxième molécule d'ubiquinol se fixe au site Q_o , transfère au cytochrome *b* ses deux électrons dont l'un gagne le cytochrome *c* et l'autre la semi-ubiquinone située au niveau de Q_i . La réduction complète en ubiquinol est accompagnée de la captation de deux protons de l'espace matriciel. Le bilan global d'une réaction complète du cycle Q comprend donc l'expulsion dans l'espace intermembranaire de quatre protons issus des deux molécules d'ubiquinol oxydées au site Q_o et la captation de deux protons de la matrice pour former la molécule d'ubiquinol au site Q_i {Mazat, 2010}.

L'équation récapitulative du cycle Q est la suivante {Trumpower, 1990} :



Patient	Sexe	Age de début	Signes cliniques principaux	Taux de lactate élevé	Autres	Référence
1-2	M	8 ans 33 ans	Faiblesse, ataxie	/	/	Spiro 1970
3 *	M	Enfance	Faiblesse, Int exercice	oui	/	Morgan-Hughes 1977, 1987
4	F	33 ans	Faiblesse, ataxie, démence, surdité, RP	oui	Décès à 49 ans	Morgan-Hughes 1982, 1987
5	M	2 ans	Hypotonie, faiblesse, ptosis, Int. exercice, atrophie cérébelleuse	Oui	EEG anormal	Sengers 1983
6 *	F	9 ans	Int exercice sévère, faiblesse	oui	/	Darley-Usmar, 1983 Kennaway 1984
7	M	Naissance	Hypotonie, léthargie, vomissements, acidose	oui	Décès à 5 mois,	Behbchani 1984
8	F	Enfance	Faiblesse, Int exercice , Ptosis	oui	/	Hayes 1984
9 *	F	Néonatal	Cardiomyopathie, troubles déglutition	/	Décès à 4 semaines	Papadimitriou 1984
10-11	F/M	Enfance/15 ans	CPEO, Faiblesse, Int exercice sévère	oui	/	Morgan-Hughes 1984, 1987
12	F	24 ans	Faiblesse, Int exercice, Ptosis	/	/	Morgan-Hughes 1985,1987
13	M	Enfance	Douleur musculaire, Int exercice sévère	oui	/	Reichmann 1986
14	M	Enfance	Hypotonie, troubles déglutition, mouvements anormaux, retard mental	/	/	Scholte et Przyrembel 1987
15	M	Naissance	RCIU, rein polykystique,	oui	Hypoglycémie	Birch-Machin 1989
16-20	3M/2F	/	Cardiopathie dilatée	/	/	Marin-Garcia 1995
21-23 **	1M/2F	Naissance	Fanconi, RCIU, hypotonie	oui	Décès entre 2 jours et 15 semaines	Moris 1995
24-29	/	Période néonatale à 7 ans	4 patients : atteinte multisystémique, tr neurologiques/ 2 patients : myopathie	4 patients : oui/ 2 patients : non	2 décès à 7 et 8 mois	Moumans 1997

Tableau 4 : 29 cas de patients avec déficits en complexe III publiés de 1970 à 1997 sans identification génétique

M : masculin, F : féminin, Int exercice : intolérance à l'exercice, CPEO : Ophtalmoplégie externe progressive chronique, RCIU : Retard de croissance Intra-Utérin, RP : rétinite pigmentaire

Certains cas ont été attribués ultérieurement à une mutation de *MT-CYB* (*) ou de *BCS1* (**).

Comme nous l'avons vu au début de ce paragraphe, il existe différents inhibiteurs du cycle Q. L'antimycine A agit au niveau du site Q_i et bloque le flux d'électrons de l'hème b_H vers la quinone empêchant ainsi la formation de la semi-ubiquinone. Le myxothiazole et la stigmalline se fixent quant à eux au niveau du site Q_o et bloquent ainsi le flux d'électrons vers ISP et l'hème b_L . Enfin UHDBT est un analogue de la quinone, inhibant le transfert d'électrons au centre Q_i {Nicholls, 2002 ; Voet, 2005}.

2. Déficits humains en complexe III

Les déficits en complexe III sont les moins nombreux des déficits respiratoires rencontrés chez l'homme (2 à 15% en fonction des études) {Mourmans, 1997; Rustin, 1994}. Ils partagent la variabilité des symptômes et la double origine génétique des maladies mitochondriales dans leur ensemble. Les atteintes peuvent être multisystémiques ou tissu-spécifiques, les plus fréquentes étant des atteintes musculaires. Jusqu'en 1996, aucune cause génétique en lien direct avec un déficit en complexe III n'avait été identifiée {Bouzidi, 1996 ; Dumoulin, 1996}. Depuis, des mutations pathogènes ont été décrites dans *MT-CYB* codant le cytochrome b, seul gène mitochondrial du complexe III, dans 3 gènes nucléaires codant pour des sous unités du complexe III (*UQCRB*, *UQCRQ* et *UQRC2*) et dans trois gènes nucléaires codant pour des facteurs d'assemblage du complexe III (*BCS1L*, *TTC19*, *LYRM7*).

a) Etudes antérieures à la découverte d'une cause génétique

Un certain nombre de cas étudiés avant 1996 ainsi que l'étude de Mourmans publiée en 1997 sont répertoriées dans le Tableau 4 {Birch-Machin, 1989; Kennaway, 1988; Marin-Garcia, 1995; Morris, 1995; Mourmans, 1997}.

b) Causes génétiques identifiées

(1) *MT-CYB*

Les altérations de *MT-CYB* ont été les premières identifiées {Bouzidi, 1996; Dumoulin, 1996}. Elles sont aussi à l'heure actuelle les plus fréquentes. Elles présentent de façon caricaturale les interrogations nées de l'observation des mutations délétères de l'ADNmt. En effet certaines de ces mutations sont présentes uniquement dans le muscle où elles sont en proportion très élevée proche de 100%. Ces mutations sont très souvent des mutations non-sens conduisant à une protéine tronquée ou absente. Il existe aussi des mutations faux-sens {Legros, 2001}. Elles entraînent typiquement une réduction très importante de l'activité du complexe III. La maladie associée à ces mutations se manifeste à

Syndrome	Changement nucléotidique / Changement d'acide aminé	Homo / hétéro plasmie	Sexe	Age de début	Clinique	Acidose lactique	Ref.
Encéphalo-myopathies	14787 _14790 del 4, 114Thr fs*37	h 65%M 60%Sg	M	6 ans	Parkinsonisme puis MELAS	Oui	De Coo 1999
	A15579G Y278C	h 88%M 15%L	F	6 ans	surdité, int ex, retard mental, épilepsie	Oui	Wibrand 2001
	T14849C S35P	h 69%M	M	7 mois	Hypotonie, somnolence, retard développement , rhabdomyolyse, int ex, Sd Wolff-Parkinson – White, RP, dysplasie septo-optique	Oui	Schuelke 2002
Myopathies	G14846A G34S	h 85%M	F	Enf.	Int ex, faiblesse, myopathie	Oui	Andreu 1999
	G15084A W133Ter	h 70%M	M	Enf	Int ex, myopathie	Oui	
	G15168A W141Ter	h 87%M	F	Enf	Int ex, myopathie	Oui	
	15498del24 251GDPDNY TL-258	h 50%M	M	30 ans	Int ex, faiblesse, myoglobulinurie, myopahtie	Non	
	G15723A W326Ter	h 87%M	M	Enf	Int ex, faiblesse, myopathie	Oui	
	G15059A G190Ter	h 63%M	M	12 ans	Int ex, faiblesse, myoglobulinurie, myopahtie	Oui	Andreu 1999
	G15150A W135X	h 60%M	M	8ans	Myopathie	/	Legros 2001
	T15197C S151P	h 80%M	M	66ans	Myopathie	/	
	G15242A G166X	h 87%M <1%Sg	F	9 ans	Int ex, encéphalopathie apparue plus tardivement	Oui	Keightley 2000
	G15497A G251S	H	M	22 ans	Int ex	/	Tarnopolsky 2004
	G15615A G290D	h 89%M	M	/	Int ex	/	Dumoulin 1996
	G15762A G339E	h 85%M	F	25 ans	Int ex	Oui	Andreu 1998
Cardio-myopathie hypertrophique	G15243A G166E	h 90%C	/	/	CMH	/	Valnot 1999
	G15498A	h	/	/	CMH	/	Andreu 2000

Tableau 5: mutations de *MT-CYB* (hors LHON)

D'après www.mitomap.org

Int ex : intolérance à l'exercice, CMH : cardiomyopathie hypertrophique, RP : rétinite pigmentaire,

l'âge adulte par une intolérance sévère à l'effort musculaire. Les symptômes sont donc logiques avec la localisation tissulaire de la mutation. Il reste cependant à comprendre comment le tissu musculaire se maintient en la quasi-absence de complexe III. La ségrégation extrême de la mutation est également difficile à expliquer compte tenu de l'étendue du tissu musculaire et de la précocité de son origine embryologique. Ces mutations sont listées dans le Tableau 5 {www.mitomap.org, De Coo, 1999 ; Wibrand, 2001 ; Schuelke, 2002 ; Andreu 1, 1999 ; Andreu 2, 1999 ; Legros, 2001 ; Keightley, 2000 ; Tarnopolsky, 2004 ; Dumoulin, 1996 ; Valnot, 1999 ; Andreu, 1998 ; Andreu, 2000}.

De nombreuses mutations faux-sens homoplasmiques de *MT-CYB* ont été également décrites en association à des déficits souvent très modérés de l'activité du complexe III. Les symptômes qui leur sont associés sont très variés mais un tableau récurrent est celui de l'atrophie optique de Leber {www.mitomap.org}. Un certain nombre de ces mutations sont peut-être des polymorphismes rares sans caractère délétère.

(2) *UQCRB*

Une mutation non-sens du gène *UQCRB* a été décrite chez un seul patient. Celui-ci était un nourrisson présentant des épisodes récurrents d'hypoglycémie et d'acidose lactique. Cette mutation est une délétion homozygote de 4 paires de bases entre les nucléotides 338 et 341 du gène *UQCRB*. Le déficit du complexe III était profond dans le foie et les fibroblastes. La baisse du cytochrome b sur le spectre des cytochromes suggérait un défaut de l'assemblage du complexe III {Haut, 2003}.

(3) *UQCRQ*

Une seule mutation faux-sens homozygote du gène *UQCRQ* (c.208C>T ; p.Ser45Phe) a été décrite dans des familles de Bédouins présentant un phénotype neurologique sévère associant retard psychomoteur, dystonie, athétose, ataxie et hypotonie axiale modérée. L'activité du complexe III analysée dans le muscle ne montrait qu'un déficit très partiel (de l'ordre de 40%) {Barel, 2008}.

(4) *UQCRC2*

Une mutation faux-sens homozygote du gène *UQCRC2* (c.547C>T ; p.Arg183Trp) a été récemment mise en évidence par séquençage d'exome. Cette mutation a été trouvée chez trois patients issus d'une famille mexicaine consanguine présentant dès la période néonatale l'association hypoglycémie, acidose lactique, cétose et hyperammoniémie. Ce phénotype

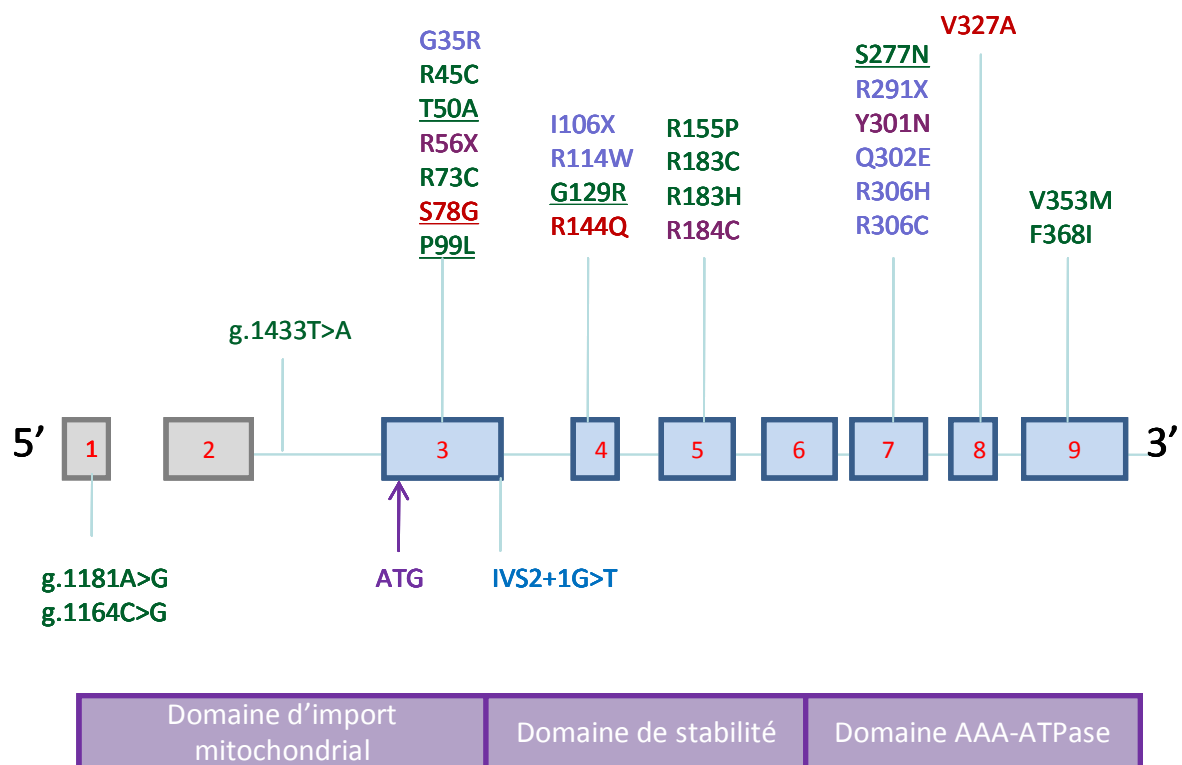


Figure 28 : Mutations pathogènes du gène *BCS1L*

Mutation → Syndrome de Bjornstad

Mutation → Syndrome GRACILE

Mutation → Déficit en complexe III
+ encéphalopathie +/- atteinte viscérale

Mutation → Phénotype divers

Mutation retrouvée à l'état homozygote

Exons non-codants en gris et codants en bleu

clinique est donc très proche de celui observé chez le patient présentant la mutation d'*UQCRB.L*. L'activité du complexe III analysée dans les fibroblastes montrait un déficit marqué {Miyake, 2013}.

(5) *BCS1L*

La large majorité des mutations nucléaires à l'origine d'un déficit en complexe III sont localisées dans le gène *BCS1L*. Ces mutations sont répertoriées dans la Figure 28 {Al-Owain, 2013 ; Blazquez, 2009 ; de Lonlay, 2001 ; De Meirleir, 2003 ; Diaz, 2011 ; Fellman, 2011 ; Fernandez-Vizarra, 2007 ; Gil-Borlado, 2009 ; Hinson, 2007 ; Kotarsky, 2010 ; Moran, 2010 ; Ramos-Arroyo, 2009 ; Siddiqi, 2013 ; Tuppen, 2010 ; Visapaa, 2002 ; Yanagishita, 2013}. Elles aboutissent à trois phénotypes cliniques principaux :

- Formes peu sévères : Syndrome de Bjornstad associant surdité neuro-sensorielle et pili torti (cheveux extrêmement fragiles et en torsion à 180° par rapport à l'axe normal)
- Formes intermédiaires : encéphalopathie isolée ou atteinte neurologique associée à des signes de Bjornstad
- Formes néonatales sévères :
 - Soit syndrome GRACILE (Growth Retardation, Aminoaciduria, Cholestasis, Iron overload, Lactic acidosis, Early death) associant retard de croissance intrautérin, aminoacidurie due à une tubulopathie proximale de type Fanconi, cholestase (avec stéatose et cirrhose), surcharge en fer, acidose lactique et mort précoce,
 - Soit encéphalopathie précoce associée à des atteintes viscérales réalisant des tableaux souvent très proches du syndrome GRACILE du fait de la présence d'une tubulopathie proximale et/ou d'une atteinte hépatique associant insuffisance hépato-cellulaire, cholestase et cytolysse.

Les relations entre mutations de *BCS1L* et phénotypes cliniques restent peu expliquées. Le site de la mutation sur le gène n'explique pas le phénotype clinique. En effet, des mutations causant le syndrome moins sévère de Bjornstad peuvent se situer à proximité de mutations responsables des deux phénotypes plus sévères {Kotarsky, 2010} (Figure 28).

Les déficits d'activité du complexe III associés aux mutations de *BCS1L* sont très variables en fonction des patients et des tissus étudiés. On peut toutefois noter que dans les lymphocytes des patients atteints de la forme peu sévère du syndrome de Bjornstad, l'activité en complexe III n'est que faiblement diminuée {Hinson, 2007}. Pour les patients atteints de la forme la plus sévère à savoir le syndrome GRACILE, l'activité du complexe III est diminuée dans le foie et le rein mais normale dans les fibroblastes {Kotarsky, 2010; Visapaa, 2002}.

Les patients atteints de la forme néonatale avec encéphalopathie ont un déficit en III dans le foie et parfois le muscle {De Lonlay, 2001}.

Le déficit en complexe III semble être dû à un défaut d'assemblage de la protéine Rieske comme l'a montré l'étude de Moran par Blue Native Page en 2 dimensions sur fibroblastes de déficits néonataux ou de syndromes de Bjornstad {Moran, 2010}.

Une surcharge en fer hépatique a été remarquée pour certains patients porteurs de la mutation responsable du syndrome de GRACILE, suggérant un rôle de BCS1L dans l'homéostasie de ce métabolite {Visapaa, 2002}.

Enfin il a également été proposé que la physiopathologie des mutations *BCS1L* pourrait être due principalement à une production anormale d'ERO. Une augmentation de la production d'ERO a en effet été mise en évidence dans les lymphocytes de patients porteurs de mutations à l'origine de syndrome de Bjornstad ou de déficits en complexe III {Hinson, 2007; Moran, 2010}.

(6) *TTC19 (Tetratricopeptide repeat domain 19)*

L'implication du gène *TTC19* dans un déficit humain en complexe III a été montrée chez 4 patients issus de 3 familles différentes présentant deux mutations homozygotes non-sens : c.656T>G (p.Leu219X) et c.517C>T (p.Gln173X). Ces patients présentaient une atteinte neurologique : atteinte neurodégénérative lentement progressive pour 3 patients et atteinte neurologique subaiguë pour 1 patiente {Ghezzi, 2011}.

(7) *LYRM7*

Une mutation homozygote, c.73G>A (p.Asn25Asp), a été très récemment mise en évidence sur le gène *LYRM7*. Le patient était un enfant issu d'une famille marocaine consanguine ayant présenté une encéphalopathie précoce, une acidose lactique et un déficit en complexe III avec une activité résiduelle d'environ 30% par rapport au contrôle dans le muscle. Ce patient est décédé à 28 mois de défaillance respiratoire {Invernizzi, 2013}.

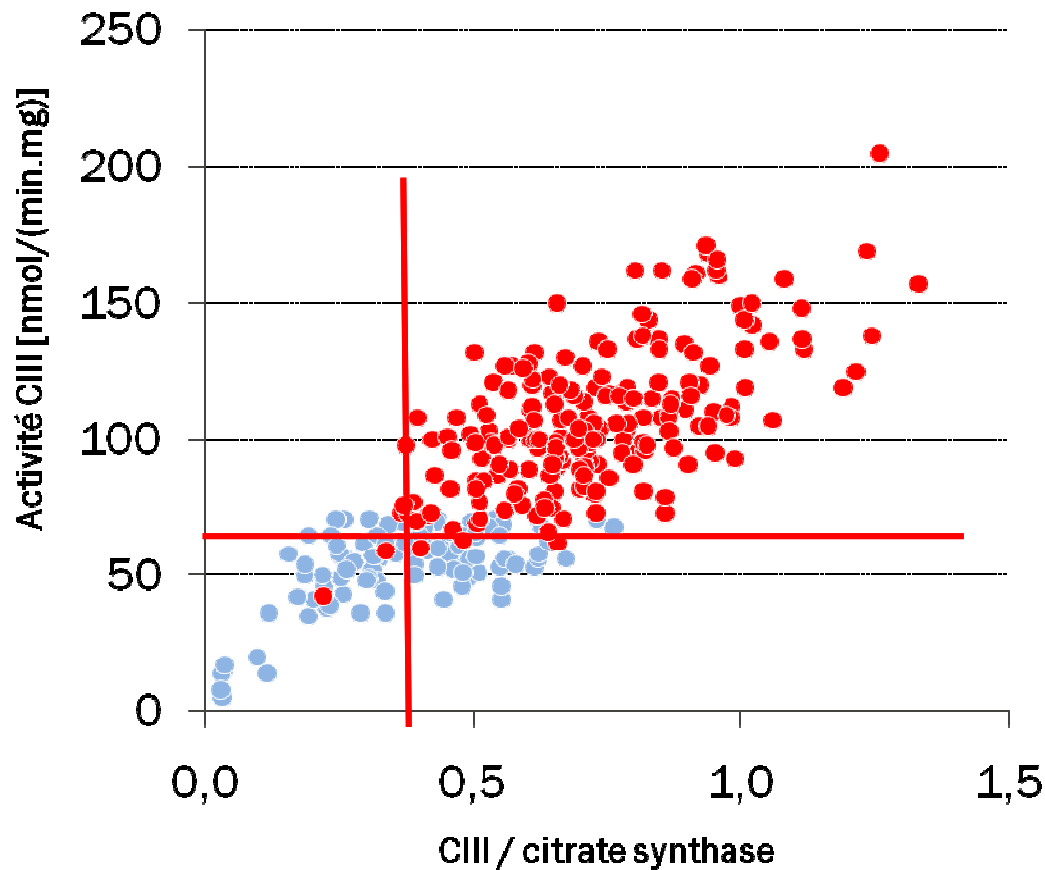


Figure 29 : Résultats du dosage des activités musculaires du complexe III en spectrophotométrie
 Mesures effectuées avant la standardisation des protocoles de dosage, et donc à 30°C; Points bleus : déficits < 5^{ème} centile
 Points rouges : échantillons « contrôles »

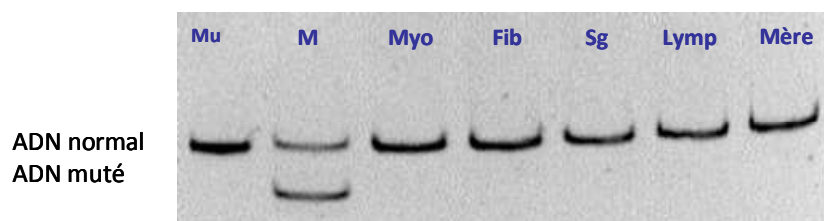


Figure 30 : Présence uniquement dans le muscle de la mutation m.15150G>A (p.Trp135X) de *MT-CYB*
 Analyse de la proportion de mutation par PCR-restriction dans différents tissus du patient (Mu : muqueuse buccale, M : biopsie musculaire, Myo : premiers myoblastes issus de la biopsie musculaire, Fib : fibroblastes, Sg : sang total, Lymp : lymphocytes) et dans les lymphocytes de la mère du patient (Mère).

B. Résultats

1. Recrutement des patients

a) Déficits en complexe III dépistés sur biopsie musculaire et/ou hépatique

Depuis le milieu des années 90, le centre de diagnostic des maladies mitochondriales de l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière a effectué le dosage des activités des complexes de la chaîne respiratoire sur biopsie musculaire et/ou hépatique de plus de 2000 patients. Ce travail a été à la base du recrutement des déficits en complexe III étudiés dans ce manuscrit.

La figure 29 présente les résultats des mesures de l'activité du complexe III dans les biopsies musculaires analysées avant la fin de l'année 2005, date à laquelle les protocoles de dosages spectrophotométriques ont été modifiés. Les valeurs obtenues avec les nouveaux protocoles sont significativement différentes et ne peuvent donc pas être montrées sur le même graphique. Un grand nombre de valeurs se situent en dessous du 5^{ème} centile des valeurs normales (en dessous du trait rouge horizontal). Pour éliminer les artéfacts liés à la qualité du prélèvement (par exemple tissu pauvre en mitochondries par remaniement fibreux), les valeurs de l'activité du complexe III ont été rapportées à la valeur de l'activité citrate synthase du même échantillon. L'activité citrate synthase sert de biomarqueur du contenu mitochondrial. Cette normalisation permet d'écarter les valeurs d'activité du complexe III situées à droite du trait rouge vertical et en dessous du trait rouge horizontal qui, bien que basses, sont normales par rapport à la citrate synthase.

Les déficits par artéfact de conservation sont plus difficiles à écarter. En effet l'activité citrate synthase résiste significativement mieux aux mauvaises conditions de conservation que les activités respiratoires. D'autre part, l'association de plusieurs déficits est fréquente dans les problèmes de conservation mais elle peut également se voir dans les déficits combinés d'origine génétique.

Au total le dosage sur biopsie musculaire ou hépatique a identifié 79 cas de déficit en complexe III avec un rapport III/citrate synthase anormalement bas ($<10^{\text{ième}}$ centile de la population normale). Ces déficits pouvaient être isolés ou associés à des déficits d'autres complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I et complexe IV le plus souvent). Les résultats des activités respiratoires mesurées dans le muscle, le foie et/ou les lymphocytes chez les patients gardés pour la suite de l'étude sont donnés en annexe dans les Tableaux 1 à 3. Plusieurs séries de valeurs normales sont données pour le muscle et le foie

Patient	Sexe	Consanguinité	Début	Décès	Foie	Système nerveux	Autres atteintes
P1	F	oui	8 mois	non	Cytolyse	non	Troubles gastro-intestinaux, troubles de la déglutition
P2	F	non	J0	non	Cytolyse	Encéphalopathie	Tubulopathie, RCIU, RGO
P3	F	oui	J0	non	Cytolyse	Encéphalopathie	Absence de développement staturo-pondéral, tubulopathie de type Toni-Debré-Fanconi
P4	M	non	6 mois	non	oui	non	Troubles de la déglutition, gain de poids réduit
P5	F	non	J0	oui (5 mois)	Cytolyse	Encéphalopathie	RCIU sévère
P6	M	oui	J0	oui (17 jours)	oui	Encéphalopathie	non
P7	M	non	J0	oui (12 jours)	oui	non	Défaillance multiviscérale, myocardiopathie
P8	M	NR	J0	non	Cytolyse	Encéphalopathie, accès dystoniques	Asthme, hypoacousie, retard du développement
P9	F	oui	6 mois	oui (NR)	non	Episodes de décompensation	Dyspnée sévère
P10	F	non	1.5 mois	non	Cytolyse	Absence atypique avec perte de contact	Symptomatologie digestive, syndrome polyuro-polydyspique
P11	F	oui	10 ans	non	non	Encéphalopathie progressive	non
P12	F	oui	3 ans	non	non	non	non
P13	F	non	J0	non	non	Hypotonie axiale	Insuffisance cardiaque, retard du développement
P14	M	non	J0	oui (3 jours)	IH	Hypotonie généralisée	Défaillance multiviscérale, RCIU sévère
P15	F	non	17 mois	oui (26 mois)	Cytolyse	Discret retard des acquisitions, hypotonie	Atteinte multiviscérale, myopathie

Tableau 6 : Présentation clinique des 15 patients de l'étude

NR : non renseigné ; F : Féminin ; M : Masculin ; J0 : naissance; RGO : reflux gastro-oesophagien, RCIU : retard de croissance intra-utérin, IH : insuffisance hépatocellulaire

pour servir de références pour les échantillons analysés avec les techniques correspondantes {Medja, 2009}. Les valeurs normales données dans ces tableaux correspondent au 10° et 90° centile.

b) Présence d'un déficit enzymatique dans les fibroblastes cutanés

La caractérisation des déficits en complexe III nécessitait de disposer de fibroblastes cutanés des patients. Ceux-ci n'étaient disponibles que pour 20 des 79 patients. Huit de ces 20 fibroblastes ne présentaient aucun déficit des complexes II, III, IV qui sont mesurés en routine diagnostique. Pour deux d'entre eux, provenant de patients porteurs de mutations du cytochrome b, nous avons pu montrer que l'absence de déficit était liée à l'absence de la mutation (Figure 30). Il nous restait donc 12 populations de fibroblastes présentant un déficit significatif des activités de la chaîne respiratoire.

Nous avons ajouté à notre série deux populations de fibroblastes provenant de patients publiés avec un déficit en complexe III de cause identifiée. Ces deux lignées nous apportaient des modèles de conséquences cellulaires et moléculaires de déficits en complexe III validés par l'identification de la cause du déficit. Ils nous ont été fournis par les Dr Slama et Boutron de l'hôpital du Kremlin-Bicêtre. La première lignée (P1) dérive d'un patient porteur de mutations de *UQCRB* {Haut, 2003}. L'autre lignée (P4) est dérivée d'un patient porteur d'une mutation homoplasmique de *MT-CYB* {Haut, 2004}.

Aux quatorze patients déjà inclus dans l'étude, nous avons ajouté un patient (P8) pour lequel nous ne disposions pas de dosage dans le foie, le muscle ou les lymphocytes mais dont les fibroblastes présentaient de façon très reproductible un déficit isolé en complexe III.

Les résultats des activités observées dans les fibroblastes avec les protocoles standardisés sont donnés en annexe dans les Tableaux 4 et 5.

c) Tableau clinique des patients de l'étude

Les données cliniques et biologiques des patients de l'étude sont schématisées dans les Tableaux 6 et 7. Les histoires individuelles des différents patients sont résumées dans les paragraphes qui suivent.

Patient 1 : Les données sur cette patiente sont issues de son cas clinique publié rapportant la première mutation impliquant le gène *UQCRB* {Haut, 2003}. Elle est le premier enfant d'un couple de parents sains et consanguins et naît à terme après une grossesse normale. Son histoire débute à l'âge de 8 mois avec une gastro-entérite aigüe ayant entraîné déshydratation, tachypnée et atteinte hépatique. Elle souffre également de troubles de la

Patient	Lactatémie/ lactatorrachie	Acidose métabolique	Bilan hépatique	Autres perturbations biologiques	Biopsie musculaire	IRM cérébrale/EEG
<u>P1</u>	11 ; NR	Oui (6)	ASAT = 125 UI/L, ALAT = 65 UI/L	Glycémie 0.32g/l, ala urinaire ↑	/	/
<u>P2</u>	5.2 ; 1.8	Oui (16)	ASAT= 226 UI/L, ALAT = 215 UI/L GGT = 118 UI/L	glycosurie, protéinurie, anémie	Lipidose	IRM : retard de myélinisation, EEG : mal structuré
<u>P3</u>	6.5 ; NR	Non (23)	ASAT = 156 UI/L, ALAT = 156 UI/L GGT = 102 UI/L, acides biliaires = 36µg/l (N0-6)	tyr, ala et pro (sg) ↑	NI	IRM : NI, EEG : surcharge lente diffuse
<u>P4</u>	NI ; NI	Non	Bilan hépatique perturbé	NI	/	IRM (18 mois) : NI
<u>P5</u>	NR ; NR	Non	ASAT= 300 UI/L, ALAT= 88 UI/L, GGT= 500 UI/L, PAL augmentées	NI	/	EEG NI
<u>P6</u>	NR ; augmentée	Oui	Bilan hépatique perturbé	Anémie	/	IRM : NI, EEG : mal structuré
<u>P7</u>	22 ; NR	Non	NR	NR	/	/
<u>P8</u>	7,6 ; NR	Oui (20)	ASAT= 190 UI/L, ALAT= 48 UI/L	CPK = 5600 UI/L	NI	IRM : atrophie corticale
<u>P9</u>	5.18/8	Oui	NI	NH3 = 64 µM Glycémie= 0.63 g/l	/	EEG : NI
<u>P10</u>	1.47 ; NR	Non	ASAT=138UI/L, ALAT= 97UI/L	Aminoacidémie↑	Prédom. I Lipidose	EEG lent IRM : HS SB périventriculaire
<u>P11</u>	1.31/3.28	Non	/	/	Quelques inclusions / II	IRM : atrophie cérébelleuse, nécrose des putamens,
<u>P12</u>	14 ; NR	Non	/	/	Prédom fibres type I	/
<u>P13</u>	3 à 10 /7.5	Non	/	/	Agr. mitoch., Lipidose	/
<u>P14</u>	18 ; NR	Non	TP = 16%, facteur V = 6%, ASAT= 329 UI/L, ALAT= 44 UI/L	ala pro (sg) ↑	/	/
<u>P15</u>	Hyperlactatémie ; 3.72	Oui (5)	ASAT et ALAT augmentées	HypoNa, HypoK	Prédom I, Lipidose	IRM : NI

Tableau 7 : Récapitulatif des investigations réalisées pour les 15 patients
NR : non renseigné ou non fait ; NI : normal ; M : muscle ; F : foie ; ala : alanine ;
pro : proline ; tyr : tyrosine ; Na : sodium ; K : potassium I ; fibres de type I ; II :
fibres de type II ; lactates en mmol/l ; acidose métabolique HCO₃⁻ en mmol/l..

déglutition. Le bilan biologique montre alors une acidose lactique, une hypoglycémie, une acidose métabolique, une hyperalaninémie et une atteinte hépatique modérée. La patiente présentera ensuite deux épisodes d'acidose métabolique à 2 ans et 2 ans et demi.

Patient 2 : Cette patiente est le premier enfant d'un couple de parents non-consanguins. Un retard de croissance intra-utérin est tout d'abord noté pour cette patiente qui pèse 1,950 kg à la naissance. A 1 mois et demi, l'enfant n'a toujours pas pris de poids et présente une tubulopathie importante, un reflux gastro-oesophagien, une hypotonie axiale et une hypertonie périphérique. Elle a parfois également des accès d'hypertonie postérieure. Le bilan biologique montre une acidose métabolique avec acidose lactique, une cytolysé hépatique et une anémie. Sa maladie est rapidement rapportée à des mutations du gène *BCSIL*.

Patient 3 : Cette patiente est le deuxième enfant d'un couple de parents consanguins. Elle est née à terme. Une première fille née en 1990 est décédée à l'âge de 3 mois d'une maladie identique à celle de sa sœur. La patiente 3 présente un tableau néonatal d'acidose métabolique chronique avec insuffisance hépato-cellulaire, cholestase, et tubulopathie de type Toni-Debré-Fanconi. Elle développe rapidement une encéphalopathie sévère associant retard psycho-moteur global, hypotonie centrale, hypertonie périphérique avec syndrome pyramidal. Cette patiente fait partie des premiers cas rapportés de maladie due à des mutations *BCSIL*. Elle est le patient 3 dans la publication du Dr de Lonlay parue en 2001 {de Lonlay, 2001}.

Patient 4 : Les données sur ce patient sont issues de son cas clinique publié rapportant l'implication du gène *MT-CYB* dans la maladie de l'enfant {Haut, 2004}. Il naît de parents non-consanguins au terme d'une grossesse et d'un accouchement normaux. Il se développe normalement jusqu'à l'âge de 6 mois puis surviennent des troubles de la déglutition accompagnés d'un gain de poids insuffisant. Le développement psychomoteur est alors normal. A 11 mois son bilan biologique montre une perturbation hépatique mais un retour à la normale est rapidement observé.

Patient 5 : Cette enfant naît au terme d'une grossesse gémellaire bi-choriale bi-amniotique par césarienne à 36 semaines d'aménorrhée. Le frère jumeau est en bonne santé. Un retard de croissance intra-utérin est tout d'abord noté avec, à la naissance, un poids de 1,16 kg pour 40 cm. Lors de sa première hospitalisation quelques jours plus tard, l'enfant est hypotonique avec une hypertonie axiale. Un faciès dysmorphique ainsi qu'une absence de réflexes ostéo-tendineux et de contact sont notés. L'évolution se poursuit par une dégradation rapide et à deux mois, la patiente est en dysautonomie cardio-respiratoire, dysrégulation thermique et inconfort neurologique. Elle décède à l'âge de 5 mois.

Patient 6 : Il s'agit du troisième enfant de parents cousins germains né à terme avec un poids de 3 kg. Il n'existe pas d'antécédents familiaux particuliers. Cet enfant présente une détresse neurologique dès la naissance marquée par une hypertonie, des troubles de la conscience et des myoclonies erratiques et massives. L'évolution est marquée par la persistance de cette encéphalopathie et le décès du patient. Le bilan biologique montre une hyperlactatorrachie, une acidose métabolique, des perturbations hépatiques et une anémie.

Patient 7 : Cet enfant est le premier d'un couple de parents non-consanguins. Il n'y a pas d'antécédents familiaux particuliers. Il naît par césarienne pour bradycardie et disproportion materno-fœtale. Une décompensation cardiorespiratoire survient à quelques heures de vie. Il est intubé et ventilé à 24 heures de vie et présente une myocardiopathie avec insuffisance cardiaque, une défaillance multiviscérale et une hypertension artérielle pulmonaire. Le patient décède à 12 jours de vie. Le bilan biologique montre alors une acidose lactique majeure.

Patient 8 : Les signes cliniques de ce patient ont débuté dès la naissance avec retard global du développement, accès dystoniques, malformation de l'œil droit et hypoacousie. A 15 mois apparaît un asthme sévère. Le bilan biologique montre une acidose mixte ainsi qu'une lactatémie élevée avec lactatorrachie normale. A 15 mois une cytolysé hépatique est mise en évidence.

Patient 9 : Cette patiente est issue d'un mariage consanguin de premier degré. Elle naît au terme d'une grossesse et d'un accouchement normaux. Il n'existe pas de problèmes particuliers pendant la période néonatale. Elle est hospitalisée à l'âge de 6 mois pour une acidocétose diabétique et une légère hypotonie axiale. Surviennent ensuite plusieurs épisodes de décompensation avec acidose lactique majeure, hypoglycémie, hypokaliémie et acétonurie. A 11 mois un épisode plus sévère laisse des séquelles neurologiques importantes (hypotonie axiale, nystagmus et troubles de la déglutition) qui aboutissent au décès de l'enfant.

Patient 10 : Cette enfant eutrope de parents non-apparentés naît au terme d'une grossesse normale. Du côté maternel, elle a deux demi-sœurs présentant des épisodes d'absence et deux tantes et une grand-mère présentant des migraines à répétition. Une cousine du côté paternel souffre d'une épilepsie généralisée. Des troubles digestifs de type reflux gastro-oesophagien et un syndrome polyuro-polydipsique apparaissent dès les premières semaines de vie. A un mois et demi, la symptomatologie digestive se traduit par des crises abdominales douloureuses. A 9 mois, les symptômes s'aggravent avec une alternance de constipation et de diarrhée, une pseudo-obstruction intestinale chronique, une fatigabilité à l'effort et une atteinte hépatique.

Patient 11 : Cette patiente naît au terme d'une grossesse normale. Elle est le troisième enfant d'un couple de parents consanguins au deuxième degré. Sa sœur aînée est décédée à 16 ans d'une maladie génétique. Une tante maternelle est également décédée à l'âge de 26 ans d'une maladie s'exprimant principalement par des troubles de l'équilibre. L'histoire de cette patiente est marquée par une encéphalopathie progressive ayant débuté vers l'âge de 10 ans par des troubles de l'élocution et un retard des acquisitions. A 17 ans, son quotient intellectuel est de 49. A 22 ans sont retrouvés des troubles de l'humeur. Le bilan biologique montre alors une hyperlactatorrachie.

Patient 12 : Les troubles de cette patiente débutent à l'âge de 3 ans. Elle présente initialement des accès sévères d'hypoglycémie, d'acidocétose avec hyperlactatémie et de cytolysé hépatique. La fréquence de ces accès et leur gravité ont été considérablement réduites par la prise en charge précoce des circonstances déclenchantes (jeûne et infections intercurrentes). La patiente est maintenant âgée de 22 ans, elle a un développement psychomoteur normal (elle suit des études de technicien). Son développement staturo-pondéral est normal. Elle continue cependant à présenter des accès d'hypoglycémie qui régressent rapidement sous traitement symptomatique.

Patient 13 : Il s'agit du troisième enfant de parents non-consanguins d'origine Sri-Lankaise ; les deux aînés sont bien portants. Le tableau néonatal de cette patiente comprend un retard de croissance intra-utérin (poids de naissance 1800g), une décompensation cardiaque sur bicuspidie, sténose aortique et hypertrophie du ventricule gauche, un diabète et une hypotonie axiale. Une hyperlactatémie avec hyperlactatorrachie et hyperlactaturie sont présentes. Elle décède à 6 mois d'insuffisance cardiaque.

Patient 14 : Ce patient est le premier enfant d'un couple non consanguin. Parmi les antécédents familiaux, on peut noter une perte de l'audition chez la mère depuis quelques mois. Ce patient présente un retard de croissance intra-utérin sévère et une hypotonie généralisée dès la naissance. Il décède d'une défaillance multiviscérale à 3 jours de vie. Le bilan biologique montre alors une hyperlactatémie, une hyperalaninémie et une insuffisance hépatocellulaire.

Patient 15 : Il s'agit du premier enfant d'un couple non consanguin. A 17 mois, cette patiente est hospitalisée pour atteinte multi-viscérale, altération de l'état général, hypotonie,

Patient	Muscle	Foie	Lymphocytes
P1*		I : : 44% (16%) III : : 6% (4%)	III : 35% (27%)
P2	I 64% (60%) II+III : 55% (50%) III : 54% (50%)		
P3		III : 19% (20%) II+III : 22% (19%)	
P4*			III : 31% (43%)
P5	Ininterprétable	II+III : 56% (50%) IV : 89% (71%)	
P6	absence de déficit	II : 45% (48%) III : 43% (37%)	
P7	III : 43% (30%) IV : 64% (46%)	Absence de déficit	
P8			
P9		II : 79% (46%) II+III : 27% (19%) III : 0% (0%)	
P10	I : 71% (75%) II+III : 56% (58%) IV : 62% (64%)		
P11	II+III : 38% (62%)		
P12	II : 71% (29%) III : 54% (22%) II+III : 55% (25%) IV : 100% (51%)		
P13	III : 67% (32%) II+III : 61% (33%)		
P14	I : 21% (60%) III : 10% (28%) IV : 21% (55%)		
P15	II : 52% (57%) II+III : 44% (50%) III : 66% (75%)	II : 35% (20%) III : 60% (28%) II+III : 52% (20%)	

Tableau 8 : bilan des déficits respiratoires observés dans les différents tissus des 15 patients de l'étude

* Données issues des publications sur ces patients; **valeurs absolues** et **valeurs relatives** sont données en % de la moyenne des contrôles analysés avec la même méthode spectrophotométrique

anorexie et coagulation intravasculaire disséminée. Elle décède à l'âge de 26 mois. Le bilan biologique montre une acidose majeure non corrigée par la réhydratation, une hyponatrémie, une hypokaliémie, une cytolysé hépatique (transaminases 5 à 10 fois la norme) et une tubulopathie.

d) Bilan de la cohorte

Malgré son petit nombre, ce groupe de patients présente clairement une très grande diversité aussi bien clinique que biochimique. Sur le plan clinique, un des points communs est le jeune âge des patients qui tous étaient des enfants au moment du diagnostic. Huit d'entre eux ont présenté des signes cliniques dès la naissance, cinq avant l'âge de 18 mois et enfin deux avant l'âge de 10 ans. L'apparition précoce des symptômes est en règle synonyme de sévérité et ceci est vérifié pour ces patients qui sont décédés précocement dans la moitié des cas.

La présence d'une hyperlactatémie est également très fréquente puisque retrouvée dans 80 % des cas. Elle montre la mauvaise tolérance métabolique du déficit respiratoire.

Les atteintes tissulaires quant à elles impliquaient majoritairement les systèmes nerveux et hépatique, l'atteinte tubulaire rénale n'étant rencontrée que dans les deux cas de mutations *BCS1L*. L'atteinte neurologique est extrêmement fréquente dans les maladies mitochondriales et les déficits en complexe III ne diffèrent donc pas des autres déficits pour cette atteinte. L'atteinte hépatique précoce et l'atteinte tubulaire rénale sont des présentations qui sont beaucoup moins fréquentes que l'atteinte neurologique dans l'ensemble des maladies mitochondriales. Ces deux atteintes pourraient donc être des portes d'entrée évocatrices d'un déficit en complexe III.

L'exploration des patients a été diverse empêchant la comparaison objective des altérations présentes chez les différents patients. Par exemple 10 des patients ont été explorés par le biais d'une biopsie musculaire, sept par celui d'une biopsie hépatique (après une première biopsie musculaire pour 3 d'entre eux) et enfin deux par celui des lymphocytes. Les analyses génétiques complémentaires ont été également très diverses. Pour les analyses de l'ADN mitochondrial les recherches de délétion et de déplétion n'ont été faites respectivement que chez 9 et 7 patients ; elles ont toujours été négatives.

Le profil du déficit mitochondrial était également variable à la fois dans la profondeur du déficit en complexe III (de 0 à 75% d'activité résiduelle) et dans les déficits associés. Ces données sont résumées dans le Tableau 8.

	Activité CIII Ancienne méthode	Activité CIII Nouvelle méthode
	Fibroblastes primaires	
contrôles	31 ± 7 n = 50	54 ± 21 n = 70
P1		22 ± 9 (41 %)
P2	22 ± 2 (71 %)	45 ± 14 (83 %)
P4		31 ± 8 (57 %)
P5		36 ± 18 (67 %)
P6	28 ± 21 (90 %)	54 ± 3 (100 %)
P7	18 ± 1 (58%)	67 ± 22 (124%)
P8		26 ± 20 (48 %)
P9		13 ± 9 (24 %)
P10		23 ± 13 (42 %)
P11	18 ± 8 (58%)	29 ± 9 (54 %)
P14		18 ± 11 (33%)
P15	14 ± 3 (45 %)	56 ± 4 (104 %)
	Fibroblastes immortalisés par la télomérase	
Contrôles	42 ± 14 n = 9	38 ± 11 n = 16
P3	23 ± 15 (55%)	14 ± 4 (37 %)
P12	8 ± 9 (19 %)	1 ± 2 (2 %)
P13	2 ± 1 (5 %)	7 ± 6 (18 %)
	résultats identiques entre les 2 méthodes	
	résultats différents entre les 2 méthodes	

Tableau 9 : comparaison des mesures spectrophotométriques de l'activité du complexe III sur fibroblastes par l'ancienne et la nouvelle méthode

Activité exprimée en nanomoles par minute et mg de protéines et représentée en moyenne ± écart type, soit des mesures sur échantillons contrôles dont le nombre (n) est indiqué, soit des mesures sur différentes préparations indépendantes du patient. Les résultats entre parenthèses correspondent aux pourcentage d'activité résiduelle par rapport au contrôle.

2. Analyse spectrophotométrique des fibroblastes des patients

L'expression du déficit enzymatique dans les fibroblastes a été évaluée par le dosage concomitant des activités des complexes II, II+III, III et IV ainsi que de la citrate synthase car tous ces dosages peuvent être effectués sur homogénat cellulaire sans purification mitochondriale.

a) Vérification de l'influence du changement de protocole de dosage

Huit lignées de fibroblastes avaient été analysées avant le changement de protocole de dosage de l'activité du complexe III introduit lors de la standardisation sur le territoire français des méthodes de dosage des activités mitochondriales dans le cadre du diagnostic des maladies mitochondriales {Medja, 2009}. Une différence importante entre les deux méthodes est l'augmentation de la température de dosage à 37°C au lieu de 30°C. Nous avons dans un premier temps refait les analyses de ces huit fibroblastes pour comparer les résultats obtenus avec les deux méthodes.

5 des 8 échantillons présentaient des résultats comparables avec les deux méthodes. Trois étaient divergents, dans le sens de l'apparition du déficit ou dans le sens de sa disparition (Tableau 9). Il n'existe donc pas de variation systématique qui puisse être attribuée à la méthode de dosage elle-même. Les divergences observées pourraient être dues à l'évolution des cellules des patients durant leur culture au long cours.

b) Classification du déficit exprimé dans les fibroblastes

Nous avons classé les cellules en utilisant les valeurs absolues obtenues pour les activités résiduelles des complexes III et IV ainsi que les valeurs relatives par rapport à la citrate synthase comme paramètres d'évaluation des activités de ces deux complexes (Tableau 10).

Les fibroblastes dérivés de 11 patients présentaient un déficit du complexe III significatif (activités, en valeur absolue et relative, proches du 10^{ème} centile des contrôles). Il s'agit des fibroblastes primaires des patients P1, P4, P5, P8, P9, P10, P11, P13 et P14 et des fibroblastes immortalisés des patients P3, P12 et P13. Le déficit était modéré en valeur absolue pour trois de ces fibroblastes (P4, P5 et P11) et sévère pour les autres qui présentaient une activité résiduelle inférieure à 50% de celle des contrôles (patients P1, P3, P8, P9, P10, P12, P13 et P14).

Fibroblastes primaires					
	III	IV	III/CS	IV/CS	III/IV
Contrôle (n=72)	54+/-21 (30-79)	82+/-21 (57-106)	0,78+/-0,33 (0,44-1,21)	1,11+/-0,29 (0,80-1,47)	0,72+/-0,30 (0,40-1,10)
P1	22+/-9	51+/-4	0,39+/-0,13	0,96+/-0,18	0,43+/-0,22
P2	45+/-14	53+/-27	0,52+/-0,19	0,60+/-0,27	1,16+/-0,98
P4	31 ± 8	62+/-11	0,48+/-0,08	0,98+/-0,24	0,49+/-0,04
P5	36 ± 18	91+/-62	0,46+/-0,17	1,10+/-0,27	0,45+/-0,27
P6	54 ± 3	45+/-23	0,57+/-0,11	0,46+/-0,19	1,40+/-0,80
P7	67 ± 22	60+/-35	0,83+/-0,41	0,72+/-0,49	1,48+/-1,01
P8	26 ± 20	77+/-49	0,32+/-0,17	0,95+/-0,14	0,33+/-0,15
P9	13 ± 9	78+/-49	0,16+/-0,14	0,76+/-0,24	0,20+/-0,17
P10	23 ± 13	52+/-13	0,36+/-0,19	0,79+/-0,19	0,46+/-0,22
P11	29 ± 9	65+/-14	0,44+/-0,05	0,72+/-0,48	0,44+/-0,07
P13	13+/-18	63+/-3	0,22+/-0,31	1,15+/-0,17	0,21+/-0,30
P14	18+/-11	80+/-41	0,18+/-0,06	0,89+/-0,15	0,21+/-0,08
P15	56 ± 4	55+/-44	0,80+/-0,17	0,69+/-0,39	1,51+/-1,03
Fibroblastes immortalisés					
	III	IV	III/CS	IV/CS	III/IV
Contrôle (n=16)	38+/-11 (26-57)	75+/-14 (60-90)	0,59+/-0,18 (0,31-0,86)	1,15+/-0,26 (0,84-1,52)	0,51+/-0,10 (0,34-0,65)
P3	14+/-4	50+/-14	0,23+/-0,09	0,78+/-0,10	0,31+/-0,15
P12	1+/-2	73+/-17	0,01+/-0,02	0,72+/-0,03	0,01+/-0,02
P13	7+/-6	115+/-40	0,04+/-0,03	0,66+/-0,25	0,07+/-0,05
	déficit en complexe III isolé				
	déficit en complexe IV isolé				
	déficit combiné III+IV				

Tableau 10 : Comparaison des mesures spectrophotométriques de l'activité du complexe III et IV sur fibroblastes
CS : citrate synthase

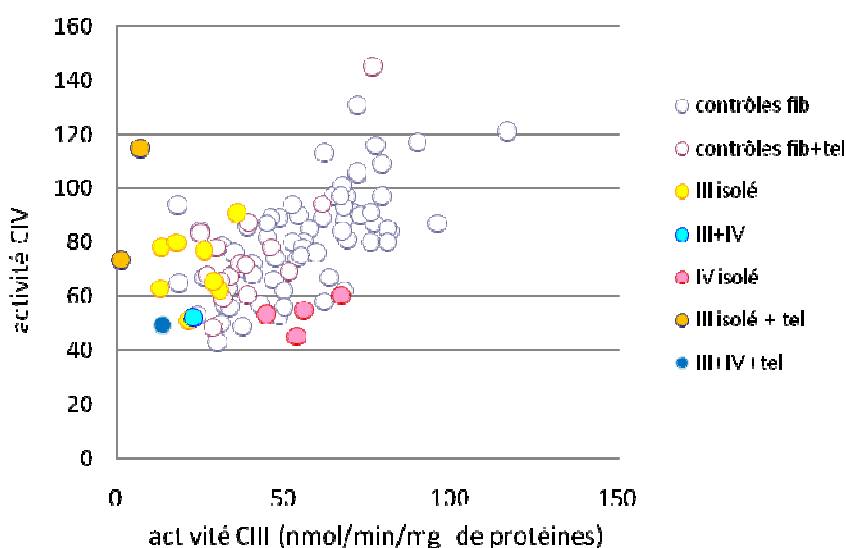


Figure 31 : Activité du complexe IV représentée en fonction du complexe III (Fibroblastes)

Les fibroblastes dérivés de 6 patients présentaient un déficit du complexe IV significatif à la fois en valeur absolue et relative. Il s'agit des fibroblastes primaires des patients P2, P6, P7, P10, et P15 et des fibroblastes immortalisés du patient P3. Comme on pouvait s'y attendre avec un dépistage portant initialement uniquement sur le complexe III, aucun de ces déficits n'était sévère puisque l'activité résiduelle du complexe IV en valeur absolue était toujours supérieure à 50% des contrôles.

En résumé, neuf fibroblastes présentaient un déficit isolé en complexe III, deux un déficit combiné des complexes III et IV, et quatre ne montraient aucune anomalie de l'activité du complexe III mais un déficit apparemment isolé en complexe IV.

Le rapport de l'activité du complexe III sur celle du complexe IV était également informatif (Figure 31). Il était normal pour les deux fibroblastes classés « III+IV » confirmant l'atteinte combinée de ces deux activités. Il était également normal pour quatre fibroblastes classés comme complexe III isolé ce qui montrait que les activités du complexe IV considérées comme normales étaient quand même relativement basses.

Les fibroblastes immortalisés présentaient un profil particulier suggérant des mécanismes propres à ces cellules (Tableau 10). L'activité en valeur relative du complexe IV était toujours significativement abaissée mais l'activité résiduelle en valeur absolue restait dans la normale pour deux populations de fibroblastes sur trois. Pour le patient P13 pour lequel nous disposions des fibroblastes primaires et immortalisés, le déficit relatif en complexe IV des fibroblastes immortalisés ne s'exprimait pas dans les fibroblastes primaires. D'autre part, la baisse du rapport de l'activité du complexe III sur celle du complexe IV (C_{III}/C_{IV}) dans tous les fibroblastes immortalisés montrait la prééminence du déficit en complexe III sur la baisse du complexe IV.

Si, pour six patients, les anomalies des complexes de la chaîne respiratoire sur culot sec de fibroblastes corroboraient ceux obtenus sur homogénat tissulaire, plus de la moitié des échantillons présentait des discordances dans le type du déficit observé (Tableau 11). Il est possible que ces discordances soient le reflet d'une réelle différence d'expression tissulaire. Cependant il est également possible qu'elles soient artificiellement créées par des artefacts dans l'analyse tissulaire liés aux difficultés techniques (matériel très petit, nombreuses possibilités de problème d'échantillonnage et de conservation).

Patients	Muscle	Foie	Lymphocytes (Haut 2003 et Haut 2004)	Fibroblastes
P1		I,III	III	III
P2	I , II+III, III			IV
P3		III , II+III		III, IV
P4			III	III
P5	Ininterprétable	II+III, IV		III
P6	absence de déficit	II, III		IV
P7	III, IV	Absence de déficit		IV
P8				III
P9		II, II+III, III		III
P10	I, II+III, IV			III, IV
P11	II+III			III
P12	II, III, II+III, IV			III
P13	III, II+III			III
P14	I, III, IV			III
P15	II, II+III, III	II, III, II+III		IV
Données discordantes tissus/fibroblastes				
Données similaires tissus/fibroblastes				

Tableau 11 : Comparaison des types de déficit exprimés dans les différents tissus des patients

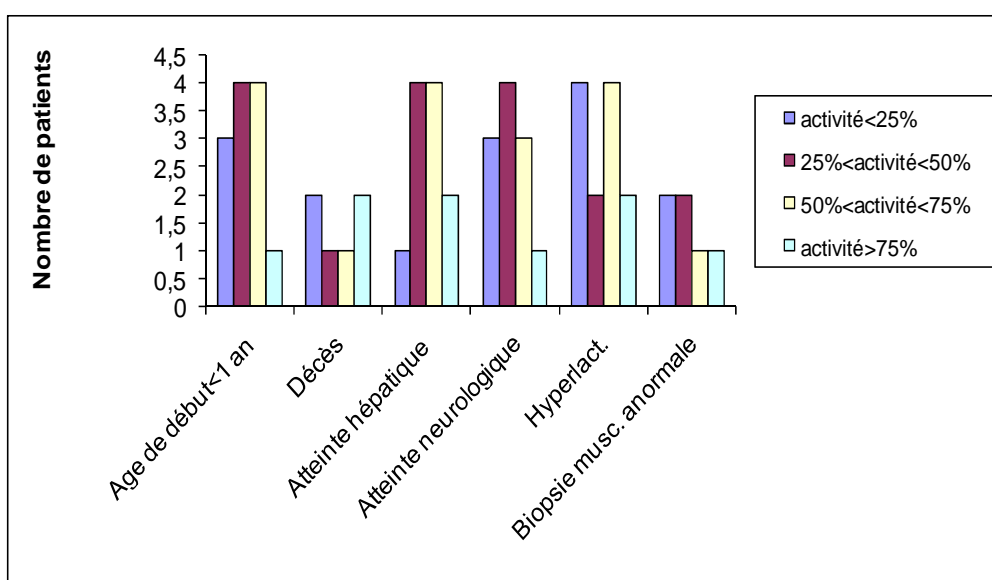


Figure 32 : Signes cliniques et biologiques en fonction de l'activité résiduelle du complexe III dans les fibroblastes
 Hyperlact. : hyperlactatémie ou hyperlactatorrachie ; musc. : musculaire
 L'activité est définie en valeur relative par rapport à la citrate synthase et en % par rapport à la moyenne des contrôles.

c) Lien entre les données cliniques et biologiques et l'activité résiduelle du complexe III dans les fibroblastes

Il était évidemment intéressant de rechercher un lien entre la sévérité chez le patient (données cliniques et biologiques) et l'activité résiduelle du complexe III dans les fibroblastes (Figure 32). Six paramètres ont été analysés : âge de début inférieur à un an, décès, présence d'une atteinte hépatique, d'une atteinte neurologique, d'un taux de lactate élevé ou d'une biopsie musculaire anormale.

Bien que le nombre de patients dans notre étude soit trop faible pour dégager des données significatives, une activité résiduelle faible du complexe III dans les fibroblastes était associée de façon prépondérante avec un âge précoce de début de la maladie et avec une atteinte neurologique. A l'inverse, aucun lien particulier ne semblait se dégager entre activité résiduelle du complexe III et décès du patient ou taux de lactate augmenté dans le sang et/ou le liquide céphalo-rachidien.

3. Impact sur la respiration des déficits en complexe III

L'impact des déficits sur le flux respiratoire des fibroblastes a été évalué sur les différents aspects de la respiration qui sont les suivants :

- **Respiration basale** = respiration sous glucose – consommation d'oxygène sous KCN,
- **Respiration maximale** = respiration maximale sous cccp – consommation d'oxygène sous KCN,
- **Respiration « ATP »** = respiration sous glucose – respiration sous oligomycine,
- **Fuite** = respiration sous oligomycine – consommation d'oxygène sous KCN,
- **Réserve respiratoire** = respiration sous concentration maximale de cccp – respiration sous glucose,
- **RCR basal** = respiration basale / fuite.

Tous les patients ont été analysés au cours d'au moins deux expériences indépendantes, sur des temps de passage différents. La valeur retenue est la moyenne des valeurs observées dans ces mesures indépendantes. Les données complètes sont données dans le Tableau 5 en annexe.

Les valeurs normales de respiration ne sont pas significativement différentes entre fibroblastes primaires et immortalisés {Auré, 2007}. Nous avons donc groupé les données provenant de ces deux types de cellules.

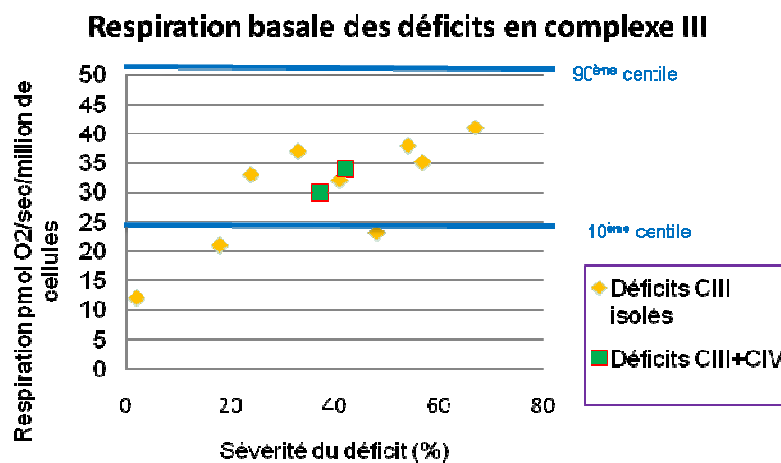


Figure 33 : Impact de la sévérité du déficit en complexe III sur la respiration basale des fibroblastes

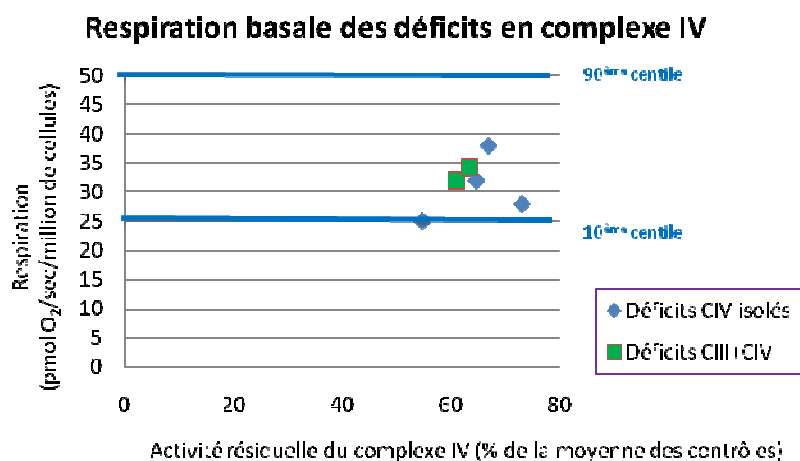


Figure 34: Impact de la sévérité du déficit en complexe IV sur la respiration basale des fibroblastes

a) Impact sur la respiration basale

Parmi les onze populations cellulaires déficitaires en complexe III, trois présentaient un ralentissement significatif de leur respiration basale (valeurs inférieures au 10^{ème} centile) (Figure 33). L'activité résiduelle du complexe III était très basse (respectivement à 3 et 18% de la moyenne des valeurs contrôles) pour deux de ces populations de fibroblastes (P12 et P13) mais elle était à 48% pour la troisième population de fibroblastes (P8). Des activités résiduelles à 24% (P9) ou 33% (P14) apparaissaient donc compatibles avec une respiration basale normale. Le déficit respiratoire observé dans les cellules P8 ne peut donc pas être expliqué simplement par la réduction de l'activité du complexe III et doit faire rechercher un autre facteur limitant, par exemple dans les activités des complexes I ou V, non mesurées par notre protocole d'investigation enzymatique.

Une seule des six populations déficitaires en complexe IV présentait une respiration basale au 10^{ème} centile des valeurs normales (P6) (Figure 34). L'absence de retentissement significatif sur la respiration basale de la diminution de l'activité résiduelle en complexe IV était attendue compte tenu de l'activité résiduelle importante de cette cohorte. L'activité résiduelle des cellules P6 était la plus basse mais elle était encore à 54% de la moyenne des valeurs contrôles. Il est actuellement impossible de dire si ces 54% sont limitants ou si les cellules P6 présentent un déficit additionnel non identifié.

b) Impact sur la respiration maximale

L'analyse de l'impact sur la respiration maximale recoupe essentiellement celle de l'impact sur la respiration basale. Toutes les cellules ayant une limitation de leur respiration basale se retrouvent dans les cellules ayant une limitation de leur respiration maximale (Figure 35).

Cependant l'étude de l'impact sur la respiration maximale montre aussi une plus grande sensibilité. En effet alors que pour la population cellulaire P6 (avec un déficit en complexe IV à 54% des contrôles) la limitation de la respiration était à peine significative en conditions basales (Figure 34), elle l'est nettement pour la respiration maximale (Figure 36). De plus la population P1 (avec un déficit isolé en complexe III à 42% des contrôles) n'était pas limitée en conditions basales (Figure 33) mais montrait une limitation significative en conditions de respiration maximale (Figure 35).

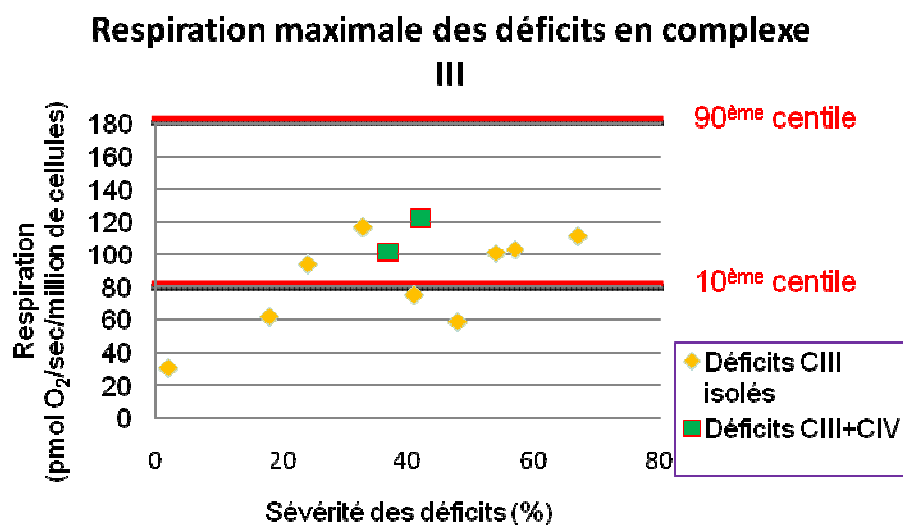


Figure 35 : Impact de la sévérité du déficit en complexe III sur la respiration maximale des fibroblastes

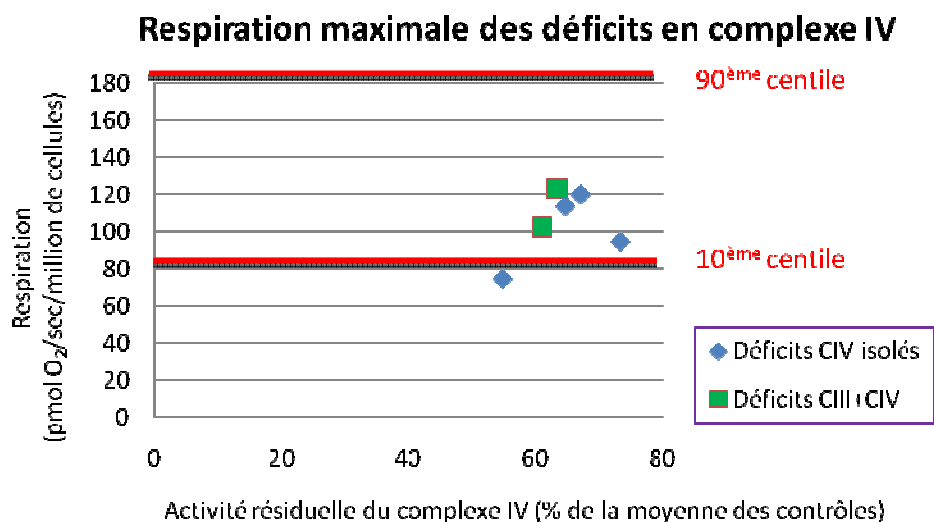


Figure 36 : Impact de la sévérité du déficit en complexe IV sur la respiration maximale des fibroblastes

Dans ce même ordre d'idée, il est intéressant de noter que la respiration maximale des fibroblastes déficitaires ne dépassait jamais les valeurs de respiration situées au 50^{ième} centile de la normale (soit 124 pmol O₂/seconde et million de cellules) alors qu'elle atteignait le 60^{ième} centile pour la respiration basale (soit 42 pmol O₂/seconde et million de cellules).

c) Impact sur les autres paramètres respiratoires

Aucun des autres paramètres respiratoires n'a montré de sensibilité plus grande que la respiration maximale à la réduction des activités des complexes III et/ou IV. La réserve respiratoire (respiration maximale moins respiration basale) est une autre façon de mesurer les capacités respiratoires maximales. Elle était significativement basse pour toutes les cellules ayant une réduction significative de la respiration maximale (P1, P6, P8, P12 et P13). Cette constatation ne faisait que confirmer que l'impact du déficit portait de façon similaire sur les respirations basale et maximale.

Au contraire la respiration servant à la production d'ATP (respiration basale - fuite) semblait moins sensible au déficit des complexes puisqu'elle n'était limitée que pour les deux populations présentant les activités résiduelles du complexe III les plus basses (P12 et P13). Cette observation est parfaitement expliquée par la réduction significative de la fuite. Les valeurs de la fuite allaient en effet de 4 à 6 pmol O₂/seconde et million de cellules dans les cellules P6, P8, P12 et P13 alors que les valeurs du 10^{ième} et du 90^{ième} centile allaient de 6 à 14 dans les cellules contrôles. Les mécanismes sous-tendant la diminution observée de la fuite peuvent être multiples : réduction du potentiel de membrane mais aussi remodelage de la composition de la membrane interne mitochondriale. Nous n'avons étudié que le potentiel de membrane (voir chapitre suivant).

Enfin le couplage entre chaîne respiratoire et synthèse d'ATP était apprécié par le rapport entre respiration basale et respiration inhibée par l'oligomycine. En dehors des fibroblastes P12 où ce rapport était à 2,2, toutes les cellules déficitaires présentaient un couplage normal avec un rapport allant de 3,5 à 6,3 pour des valeurs normales allant de 2,7 pour le 10^{ième} centile à 6,5 pour le 90^{ième} centile.

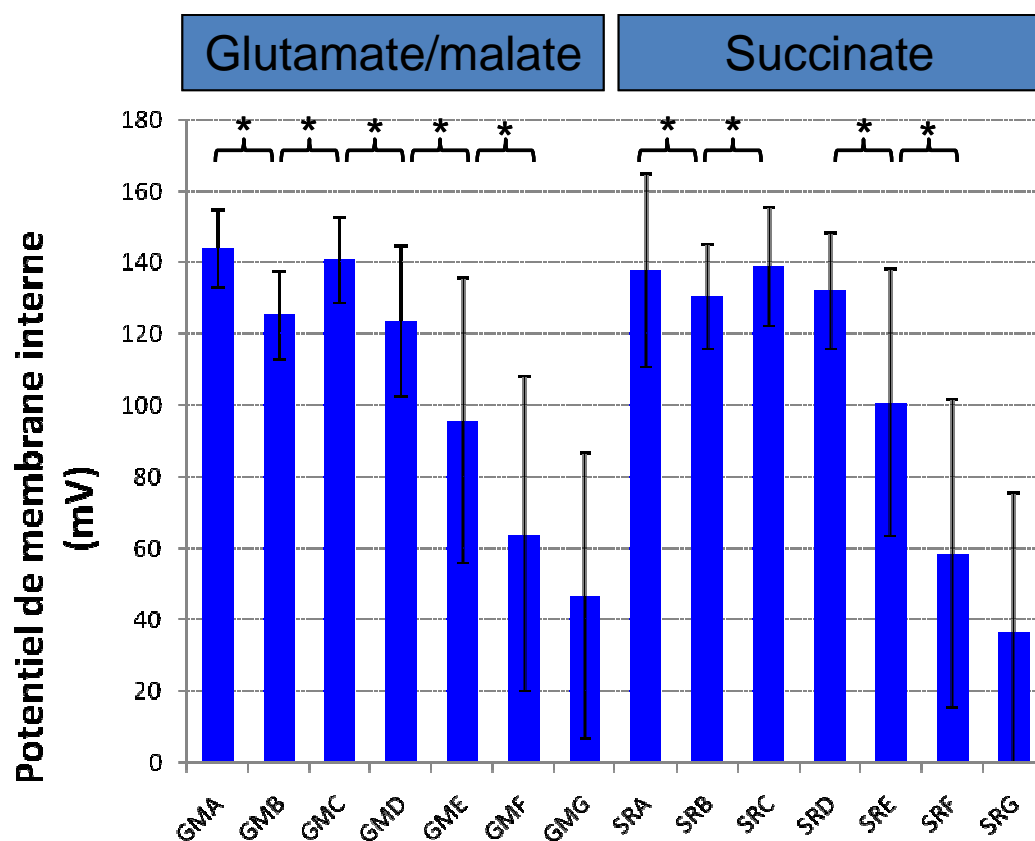


Figure 37 : Potentiel de membrane dans les cellules contrôles

Résultats exprimés en mV après calcul dans l'équation de Nernst et en moyenne et écart type des valeurs observées dans 23 analyses indépendantes sur 9 populations cellulaires contrôles différentes; GM=glutamate+malate; SR=succinate+roténone; A=conditions de base; B=+ADP 1 mM; C=+oligomycine 1 μ M; D=+cccp 1 μ M; E=+cccp 2 μ M; F=+cccp 4 μ M; G=+cccp 8 μ M; les astérisques signalent les différences significatives entre valeurs reliées par l'accolade.

4. Impact sur le potentiel membranaire mitochondrial

Une diminution du potentiel membranaire mitochondrial est une conséquence attendue des déficits de la chaîne respiratoire. Cependant cette conséquence suppose d'une part que le déficit enzymatique entraîne un ralentissement du flux des électrons dans les réactions d'oxydo-réduction et donc de l'expulsion des protons du fait du couplage entre ces deux réactions. Elle suppose aussi que la production d'ATP ne s'adapte pas et que la dissipation du potentiel reste constante. L'analyse de la respiration (chapitre précédent) montrait que la plupart des cellules maintenaient des flux respiratoires normaux de base et dans des conditions maximales induites par la dissipation du potentiel de membrane par le protonophore cccp. Nous n'avons pas analysé le flux de production d'ATP dans les cellules déficitaires.

a) Validation du protocole d'analyse du potentiel

Pour avoir une idée du potentiel membranaire mitochondrial, nous l'avons étudié dans différentes conditions qui nous permettaient d'évaluer sa réponse à des stimuli bioénergétiques. L'ajout de 1 mM d'ADP nous permettait de mimer une demande énergétique importante alors que l'oligomycine permettait de mesurer son niveau maximal en absence de synthèse d'ATP.

Pour moduler le potentiel avec l'ADP, nous devions perméabiliser les cellules avec de la digitonine. Cette perméabilisation nous permettait aussi de choisir le substrat énergétique. Ce choix n'a probablement pas d'importance dans le cas des déficits en complexe III ou IV qui sont l'objet de ce travail. Nous avons cependant décidé d'acquérir des données avec différents substrats dans l'optique d'appliquer ultérieurement ces études à d'autres déficits de la chaîne respiratoire ayant des substrats spécifiques comme les déficits en complexe I. Les substrats choisis ont donc été d'une part l'association glutamate-malate dont les électrons entrent dans la chaîne respiratoire par le complexe I et d'autre part l'association succinate-roténone donnant des électrons au complexe II.

Enfin, l'utilisation de doses croissantes de protonophore cccp nous permettait d'évaluer la capacité de la chaîne respiratoire à compenser par son accélération les fuites induites par le cccp. La condition finale avec fortes doses de cccp et inhibition de la chaîne respiratoire était indispensable pour le calcul du signal « zéro » à introduire dans l'équation de Nernst nous permettant de calculer le potentiel en millivolt.

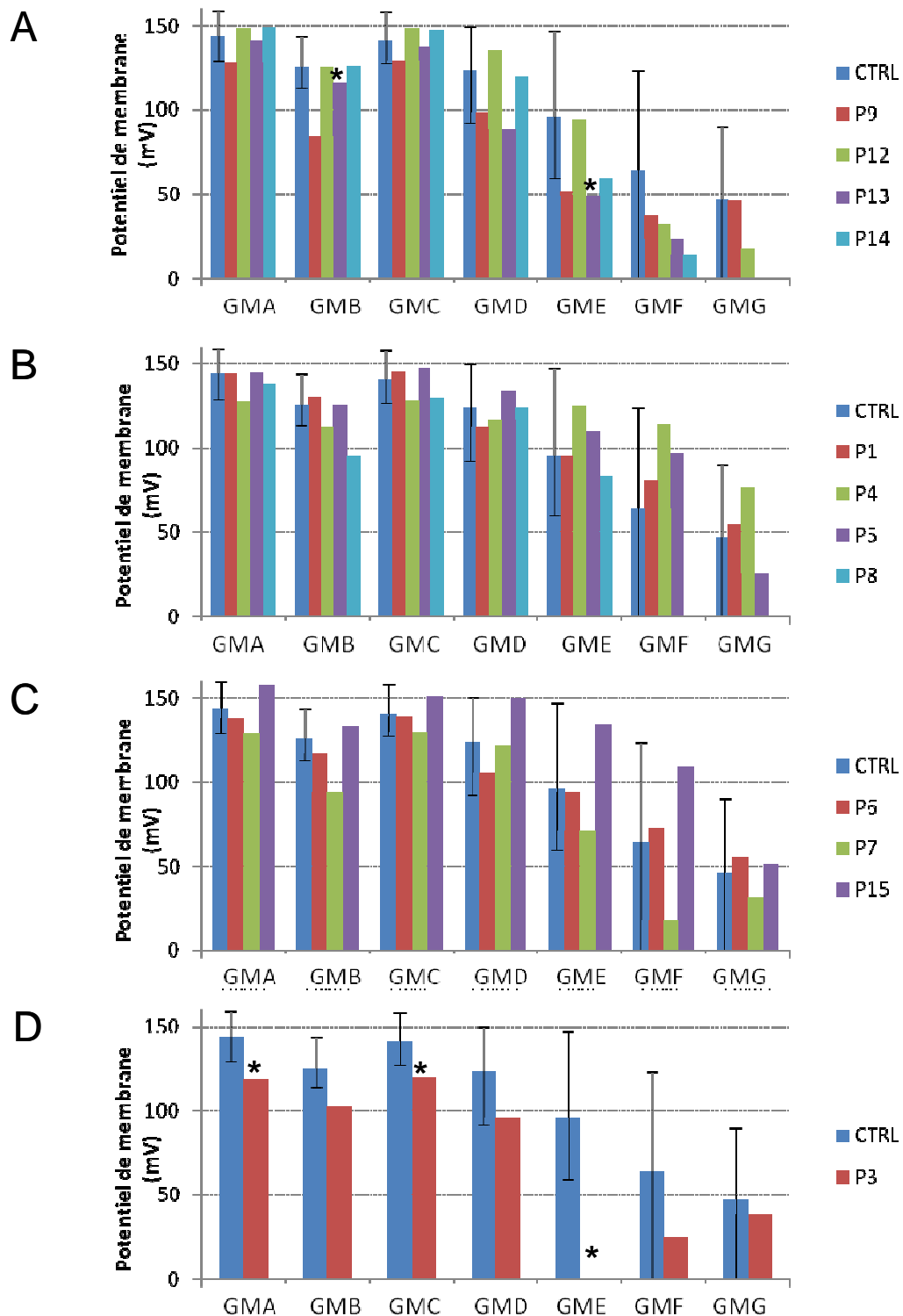


Figure 38 : Potentiel de membrane interne mitochondriale (glutamate/malate)
 A : déficit sévère en complexe III isolé (<40%), B : déficit modéré en complexe III isolé (>40%), C : déficit en complexe IV isolé, D : déficit en complexe III et IV;
 GM=glutamate+malate et A=conditions de base; B=+ADP 1 mM; C=+oligomycine 1 μ M; D=+cccp 1 μ M; E=+cccp 2 μ M; F=+cccp 4 μ M; G=+cccp 8 μ M; les valeurs des contrôles sont en moyenne, les barres d'erreur indiquent le 90^{ième} et 10^{ième} centile; les valeurs des cellules déficitaires sont en moyenne (P3, P6, P7, P12, P14 et P15 n=2 ; P1, P5 et P9 n=3 ; P13 n=4); les cellules P4 et P8 n'ont été analysées qu'une fois.

La validité des conditions choisies a été démontrée par les différences significatives entre valeurs du potentiel de membrane mitochondrial qui suivaient l'évolution attendue des différentes conditions bioénergétiques à savoir : diminution sous ADP, augmentation sous oligomycine et diminution progressive sous concentration croissante de cccp (Figure 37).

b) Séparation des patients en sous-groupes

Nous n'avons étudié le potentiel membranaire mitochondrial que dans 12 des populations cellulaires déficitaires. Pour plus de lisibilité des résultats, les cellules ont été séparées en 4 sous-groupes dont on attendait des résultats différents : déficit profond en complexe III (activité < 40%), déficit modéré en complexe III (activité >40%), déficit en complexe IV et déficit combiné III et IV (Figure 38 et Figure 39). Les résultats sont également séparés en fonction du substrat énergétique utilisé : association glutamate+malate dans la Figure 38 et succinate+roténone dans la Figure 39.

Les valeurs contrôles sont montrées en moyenne avec les barres d'erreur indiquant les valeurs du 10^{ième} et du 90^{ième} centile de façon à représenter la dispersion des résultats. Seule la moyenne des valeurs est indiquée pour les populations cellulaires déficitaires. Le calcul statistique de la significativité des résultats n'a été effectué que pour les cellules ayant été analysées au moins deux fois. Il a utilisé le test non-paramétrique de Mann et Whitney. Les valeurs différant de façon significative des valeurs contrôles ($p < 0,05$) sont indiquées sur les figures par un astérisque.

c) Résultats

Dans le protocole utilisé, les conditions qui entraînaient des anomalies significatives du potentiel étaient presque toujours des conditions où la chaîne respiratoire était sollicitée pour compenser une baisse du potentiel de membrane (7 cas sur 10). Cette baisse pouvait être provoquée par l'augmentation de l'activité du complexe V par l'ajout d'ADP (conditions B) ou la dissipation du potentiel par le cccp à faibles doses (1 ou 2 μ M, condition D ou E). Le cccp à plus fortes doses induisait l'effondrement du potentiel dans les cellules contrôles et donc a fortiori dans les cellules déficitaires. Comme attendu, les anomalies du potentiel ne dépendaient pas du substrat énergétique et étaient le plus souvent similaires en présence de succinate ou de glutamate.

Deux des quatre cellules du sous-groupe avec un déficit profond isolé du complexe III, P9 et P13, présentaient des altérations du potentiel de membrane. Celle-ci était significative pour P13 sous plusieurs conditions (Figure 38A et 39A). Ce résultat contrastait avec l'absence

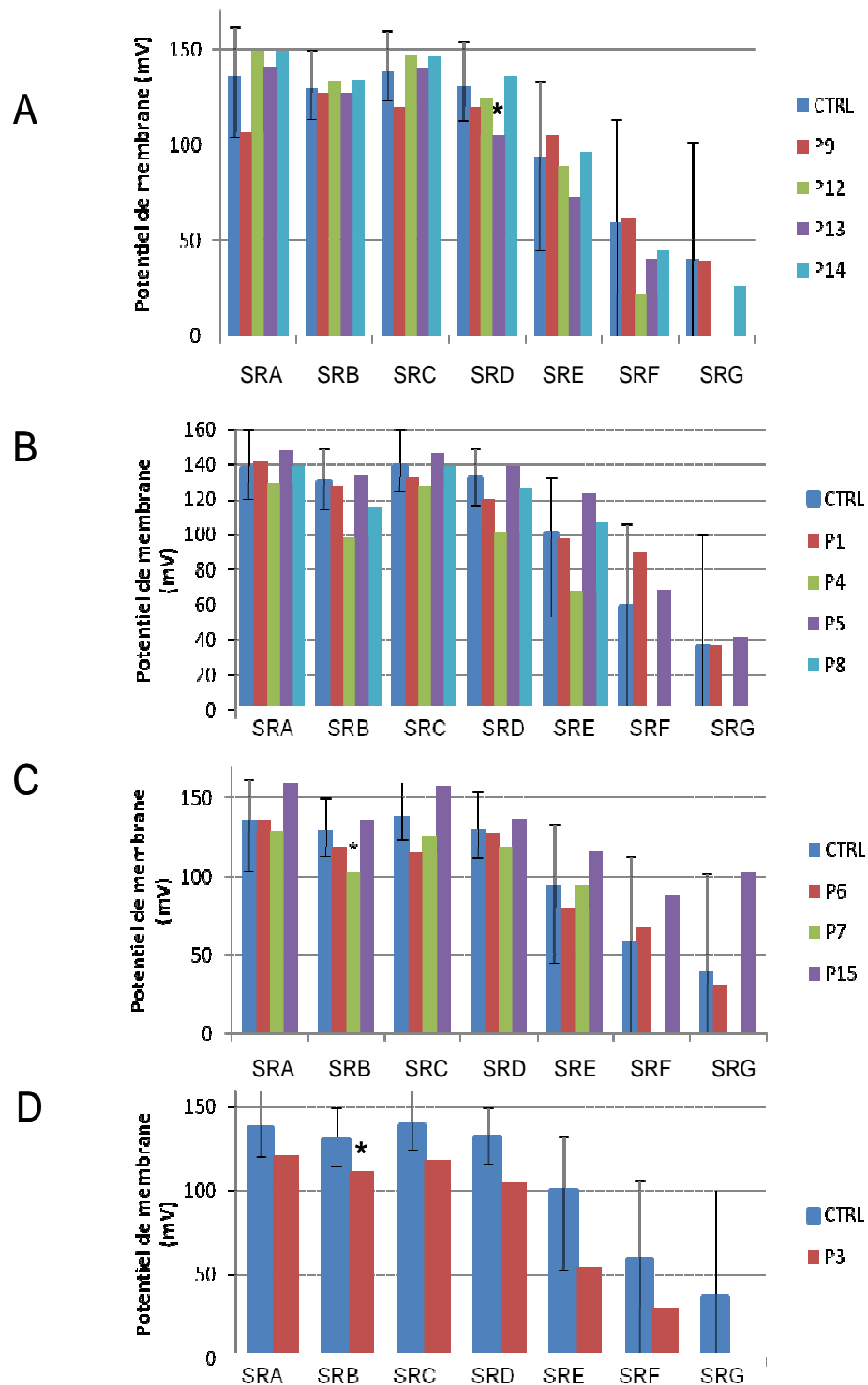


Figure 39 : Potentiel de membrane interne mitochondriale (succinate)

A : déficit sévère en complexe III isolé (<40%), B : déficit modéré en complexe III isolé (>40%), C : déficit en complexe IV isolé, D : déficit en complexe III et IV;
 SR=succinate+roténone et A=conditions de base; B=+ADP 1 mM;
 C=+oligomycine 1 μ M; D=+cccp 1 μ M; E=+cccp 2 μ M; F=+cccp 4 μ M; G=+cccp 8 μ M; les valeurs des contrôles sont en moyenne, les barres d'erreur indiquent le 90^{ème} et 10^{ème} centile; les valeurs des cellules déficitaires sont en moyenne (P3, P6, P7, P12, P14 et P15 n=2 ; P1, P5 et P9 n=3 ; P13 n=4); les cellules P4 et P8 n'ont été analysées qu'une fois.

d'altération significative dans le deuxième sous-groupe avec un déficit modéré en complexe III (Figure 38B et 39B). Ces altérations du potentiel de membrane correspondaient donc avec l'observation d'une plus grande fréquence des réductions de flux respiratoires dans les cellules avec activité résiduelle très basse du complexe III.

Cependant, il n'y avait pas toujours concordance entre flux respiratoire et potentiel. Seules les cellules P13 montraient une réduction à la fois du flux respiratoire de base et du potentiel mitochondrial. Il y avait discordance pour deux cellules du sous-groupe : les cellules P12 avec une activité résiduelle à 3% présentaient une respiration très diminuée mais maintenaient un potentiel normal ; à l'inverse, les cellules P9 avec une activité résiduelle à 24% présentaient une diminution du potentiel à la limite de la significativité mais une respiration qui restait dans les limites de la normale (Figures 38A et 39A et Figure 33). Ces différences de réaction entre cellules individuelles sont peut-être à rapporter à l'utilisation de cellules intactes pour l'évaluation de la respiration mais de cellules perméabilisées par la digitonine pour celle du potentiel de membrane. Elles peuvent aussi ne faire que refléter les variations qui restent importantes entre expériences effectuées à des jours différents.

Une anomalie du potentiel de membrane était observée dans une population cellulaire de chacun des deux autres sous-groupes (déficit en IV isolé ou combiné) (P3 et P7). Aucune ne présentait d'anomalie de la respiration, ni au niveau des flux respiratoires ni au niveau du contrôle respiratoire. Si les cellules P3 présentaient un déficit important (activité résiduelle du complexe III à 38%), ce n'était pas le cas des cellules P7 (activité résiduelle du complexe IV à 73%)

En conclusion, cette analyse a montré que 1) la plupart des cellules étaient capables de maintenir un potentiel membranaire mitochondrial normal malgré leur déficit, 2) les anomalies de potentiel étaient plus fréquentes mais inconstantes dans les cellules avec déficit profond (<40% activité résiduelle), 3) elles pouvaient s'observer en l'absence de toute réduction des flux respiratoires et en présence d'activité résiduelle importante.

5. Impact sur le métabolisme des espèces réactives de l'oxygène

Nous avons analysé le métabolisme des ERO dans les cellules déficitaires de ce projet en partie parce que la présence d'un stress oxydant est souvent proposée comme élément de la cascade délétère associée aux déficits de la chaîne respiratoire dans leur ensemble {Indo, 2007}. Ce stress oxydant dépend en effet des liens étroits existant entre fonctionnement de la chaîne respiratoire et genèse intra-mitochondriale de l'ion superoxyde. Il a parfois été expérimentalement montré par la présence de lésions oxydatives des composants cellulaires

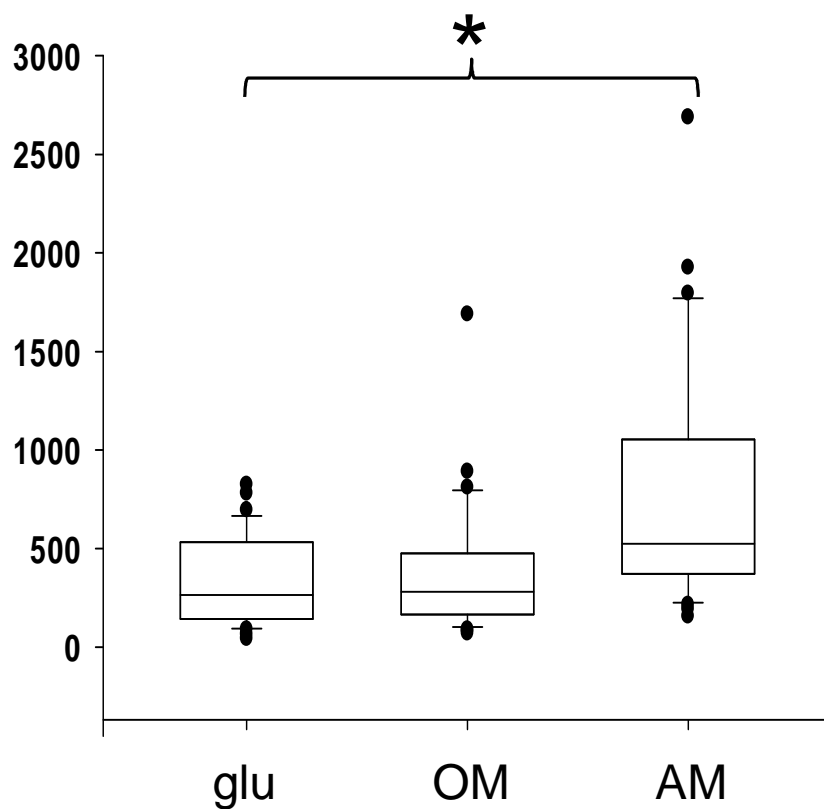


Figure 40 : Cinétique du MitoSox dans les cellules contrôles
 Résultats exprimés en pente de fluorescence observée dans 33 analyses indépendantes sur 13 populations cellulaires contrôles différentes;
 glu=incubation des cellules dans leur milieu contenant 1g/L de glucose;
 OM=+oligomycine 1 $\mu\text{g/mL}$; AM=+antimycine 2,5 $\mu\text{g/mL}$; l'astérisque signale la différence significative entre les valeurs reliées par l'accolade ($p < 0,001$).

ou par la surexpression de la SOD2 (superoxyde dismutase 2 mitochondriale à manganèse) {Venditti, 2013}.

Le rôle majeur du cycle Q dans la genèse de l'ion superoxyde dans les mitochondries était une raison supplémentaire pour analyser le métabolisme des ERO dans des déficits en complexe III.

Nous avons tenté de disséquer les différents aspects du métabolisme des ERO par des techniques complémentaires : production des ERO par l'analyse cinétique en cytométrie de flux à l'aide d'une sonde fluorescente, défense anti-oxydante par l'analyse de l'état à l'équilibre de différentes enzymes anti-oxydantes, et balance entre production et défense par l'analyse de la présence d'adduits oxydatifs sur les protéines cellulaires.

a) Production d'ion superoxyde

(1) *Validation du protocole d'analyse*

Nous avons utilisé la sonde fluorescente MitoSox pour étudier la production d'ion superoxyde dans trois conditions différentes : milieu de base (milieu de culture normal contenant 1g/L de glucose), en présence de 1 µg/mL d'oligomycine et en présence de 2,5 µg/mL d'antimycine. Ce protocole a été appliqué sur 13 cellules contrôles différentes générant un total de 33 séries de mesures, chaque population de cellules ayant été analysée en moyenne au cours de 5 expériences indépendantes (Figure 40).

L'augmentation très significative de la pente d'augmentation de la fluorescence du MitoSox entre la condition basale et l'incubation en présence d'antimycine validait notre protocole en montrant que le signal n'était pas limité dans les conditions basales et répondait de façon claire à une condition reconnue comme génératrice d'ions superoxyde.

Nous avons cependant été surpris de constater que l'oligomycine n'induisait pas d'augmentation significative de la production d'ion superoxyde alors que nous avons pu vérifier qu'elle induisait bien une augmentation significative du potentiel de membrane et un ralentissement également significatif de la respiration dans les mêmes cellules. La grande dispersion des valeurs observées dans les cellules contrôles explique peut être en partie l'absence de significativité. Nous avons donc décidé de garder cette condition pour les expériences avec les cellules déficitaires car elle représente une condition de stress métabolique importante.

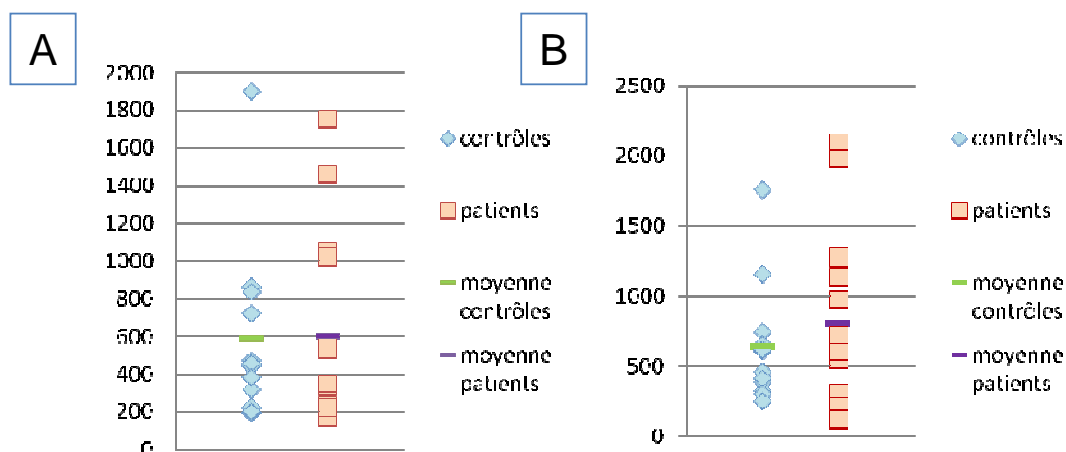


Figure 41 : Comparaison de la production d'ion superoxyde entre fibroblastes déficitaires et contrôles. Résultats exprimés en pente de fluorescence; A : condition basale sous glucose; B : incubation avec 1 µg/mL oligomycine; C : incubation avec 2,5 µg/mL antimycine;

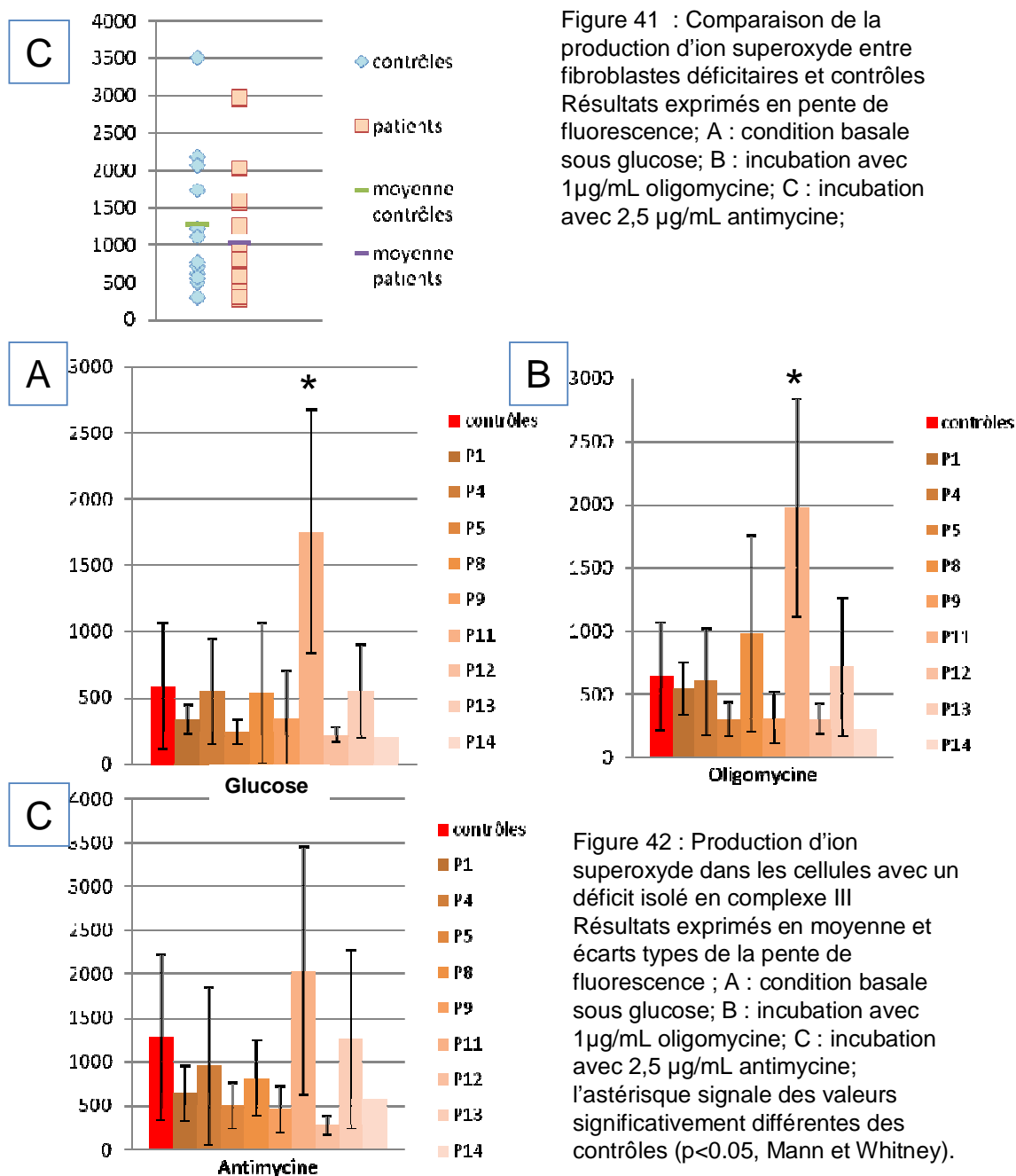


Figure 42 : Production d'ion superoxyde dans les cellules avec un déficit isolé en complexe III. Résultats exprimés en moyenne et écarts types de la pente de fluorescence ; A : condition basale sous glucose; B : incubation avec 1 µg/mL oligomycine; C : incubation avec 2,5 µg/mL antimycine; l'astérisque signale des valeurs significativement différentes des contrôles (p < 0.05, Mann et Whitney).

(2) *Analyse des cellules déficitaires*

Lorsque l'on s'intéresse à la population de fibroblastes déficitaires dans son ensemble, la production moyenne d'ERO, bien que supérieure à celle de la population contrôle en condition basale et sous oligomycine, n'est jamais significativement augmentée. Elle est même diminuée, quoique de façon non significative, sous antimycine (Figure 41). Malgré le rôle physiologique essentiel du cycle Q dans la genèse des ERO dans la mitochondrie, il apparaît donc clairement que la présence d'un déficit en complexe III ne se traduit pas systématiquement par un stress oxydant majeur.

La grande dispersion des valeurs observées dans les différentes populations de fibroblastes déficitaires montrait le caractère très hétérogène de la production d'ion superoxyde. Nous avons donc poursuivi l'analyse en reprenant les différents sous-groupes déterminés par le type de déficit spectrophotométrique (Figures 42, 43 et 44). Cette classification n'a pas montré de sous-groupe systématiquement hyperproducteur d'ion superoxyde. Dans le sous-groupe des déficits isolés en complexe III (Figure 42), seule la population cellulaire P11, avec 54% d'activité résiduelle, présentait une augmentation significative de la production d'ion superoxyde de base et sous oligomycine. Dans les deux autres groupes avec un déficit en complexe IV isolé (Figure 43) ou combiné III+IV (Figure 44), d'une part les fibroblastes P2 et P7 et d'autre part P3 (sous oligomycine) et P10 se comportaient comme les cellules P11. L'augmentation de la production d'ion superoxyde n'atteignait cependant la zone de la significativité que pour la population P7 sous oligomycine et sous antimycine.

De façon globale, la variabilité des valeurs de pente observées était donc considérable pour une même population cellulaire que celle-ci soit contrôle ou déficiente. Les causes de cette variabilité restent à déterminer. Une partie repose probablement sur la labilité des sondes fluorescentes qui s'oxydent progressivement durant leur stockage (pourtant à -20°C et sous argon). Il existe aussi un facteur de variabilité directement lié à l'état des cellules qui passent par des phases variables de quiescence, voire de sénescence, qui sont difficiles à contrôler et qui s'accompagnent de variations importantes de la genèse des ERO. Quoiqu'il en soit, cette variabilité est un obstacle majeur empêchant d'identifier des modifications significatives associées au déficit.

En conclusion, 1) la plupart des cellules ne semblaient pas produire plus d'ions superoxydes que les cellules contrôles que ce soit de base ou sous stress induit par l'oligomycine ; 2) la production d'ion superoxyde n'était pas inversement proportionnelle à

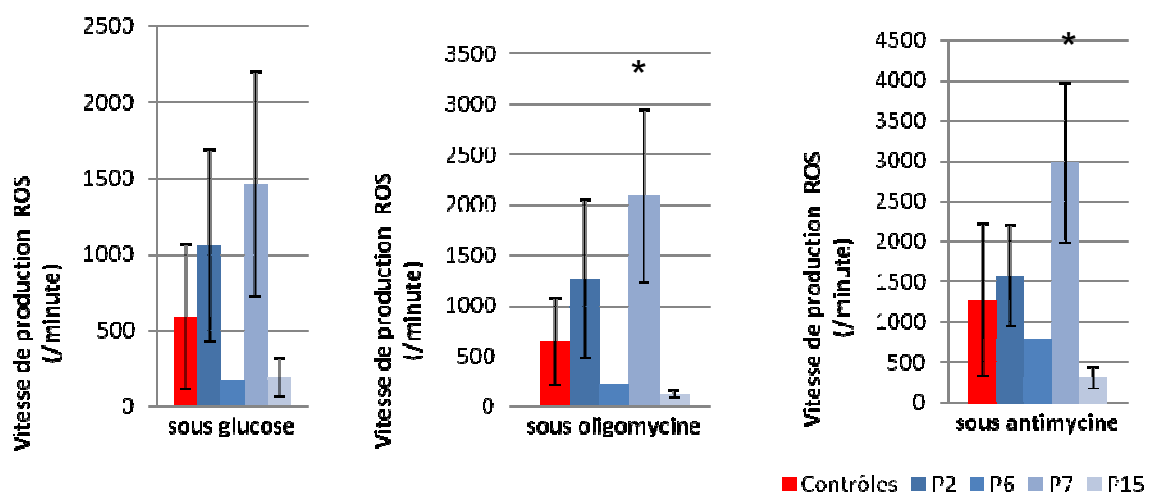


Figure 43 : Production d'ion superoxyde dans les cellules avec un déficit isolé en complexe IV

Résultats exprimés en moyenne et écarts types de la pente de fluorescence ; l'astérisque signale des valeurs significativement différentes des contrôles ($p < 0.05$, Mann et Whitney).

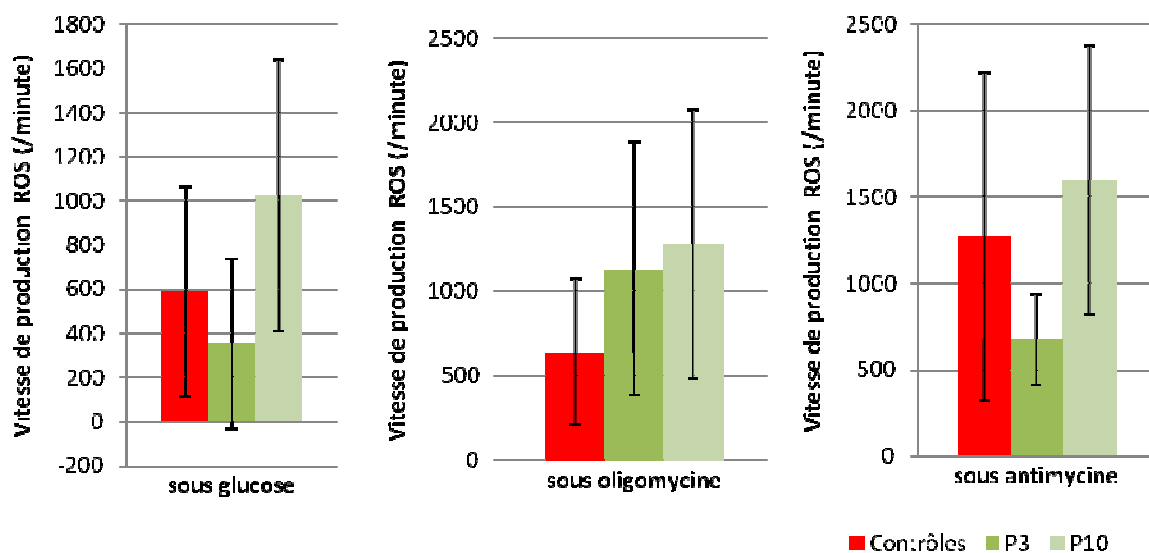


Figure 44 : Production d'ion superoxyde dans les cellules avec un déficit combiné III+IV

Résultats exprimés en moyenne et écarts types de la pente de fluorescence

l'activité résiduelle du complexe III puisque les cellules les plus déficitaires (P12 et P13) ne montraient pas d'augmentation de la production d'ion superoxyde ; 3) une production élevée, bien que non significative, d'ion superoxyde était observée dans 4 des 6 cellules avec un déficit du complexe IV, isolé ou en association avec un déficit du complexe III. Cette proportion semblait très supérieure à celle observée dans les cellules avec un déficit isolé en complexe III (1 population cellulaire sur 8). Le nombre de cellules étudiées est trop petit pour tirer des conclusions définitives mais l'efficacité catalytique du complexe IV est certainement une défense importante contre le stress oxydant évitant ainsi une stagnation des électrons au niveau du complexe III et plus particulièrement au niveau du cycle Q.

b) Moyens de défense contre le stress oxydant

Comme nous l'avons vu en introduction, les mitochondries possèdent de très nombreuses défenses contre le stress oxydant. Nous avons étudié deux enzymes mitochondriales de défense : la superoxyde dismutase 2 (SOD2) et la peroxyrédoxine 3 (PRDX3) {Venditti, 2013 ; Yamashita, 1999}. L'expression de certaines de ces défenses, notamment SOD2, est induite par le stress oxydant {St Clair, 2002}. Le niveau à l'équilibre de cette enzyme peut donc servir à authentifier la présence du stress oxydant. Cette régulation directe est moins évidente et également moins étudiée pour PRDX3 mais reste une hypothèse probable par la voie de régulation impliquant divers facteurs de transcription tels que NF- κ B (Nuclear Factor- κ B), AP-1 (Activator Protein 1) ou encore Nfr2 {Delattre, 2005 ; Jaiswal, 2004}.

Seule la PRDX3 a été analysée dans trois expériences différentes sur des préparations tissulaires différentes à chaque fois. Un gel témoin et la quantification effectuée à partir des données des trois expériences sont montrés dans la Figure 45. La quantité de protéines déposée a été vérifiée par hybridation avec un anticorps primaire dirigé contre l'actine. Un des échantillons de ce gel (P2) avait une quantité d'actine très inférieure aux autres et n'a donc pas été quantifié dans cette expérience. Pour chacune des expériences, les données de quantification du signal PRDX3 ont été normalisées par la quantification du signal de l'actine puis exprimées en % du rapport observé avec l'échantillon contrôle 1 (ctrl1) qui était présent sur les trois blots et dont la valeur était fixée à 100% permettant de regrouper les valeurs des différents blots. Aucune des populations cellulaires déficitaires ne présentait de modification significative de l'expression de la PRDX3. Toutefois, le signal de la PRDX3 était faible ce

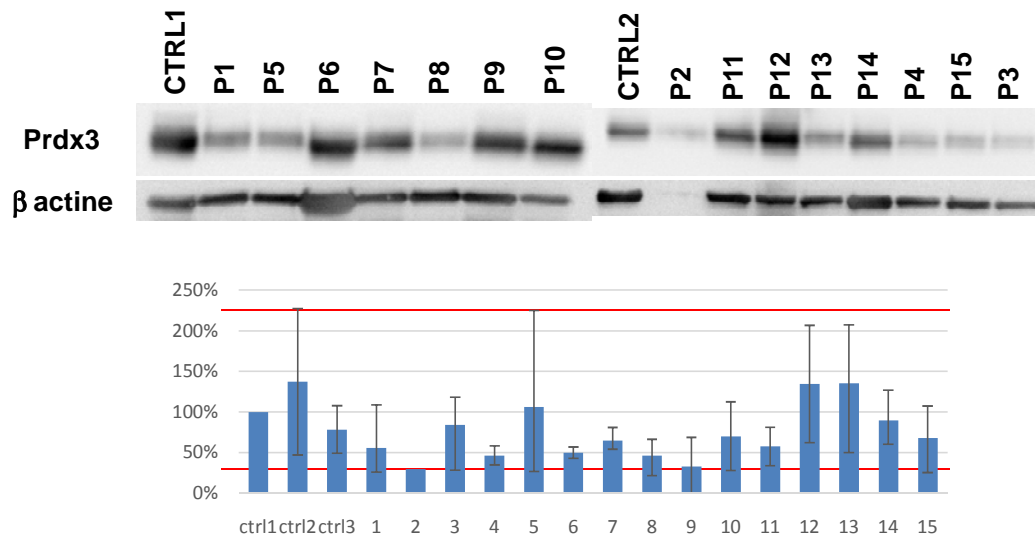


Figure 45 : Expression de la peroxyredoxine 3 (Prdx3) dans les fibroblastes de patients.
ctrl=cellules contrôles; les résultats sont normalisés par la β actine et exprimés en % par rapport au contrôle 1 (ctrl1); la barre de l'histogramme indique la valeur moyenne, le niveau supérieur la valeur maximale et le niveau inférieur la valeur minimale observée pour chacun des échantillons analysés 3 fois (1, 3, 5, 7-9, 13-15) ou 2 fois (4, 6, 10-12). Seul l'échantillon 2 n'a été analysé qu'une fois; la zone correspondant à la dispersion des valeurs contrôles est délimitée par les traits rouges.

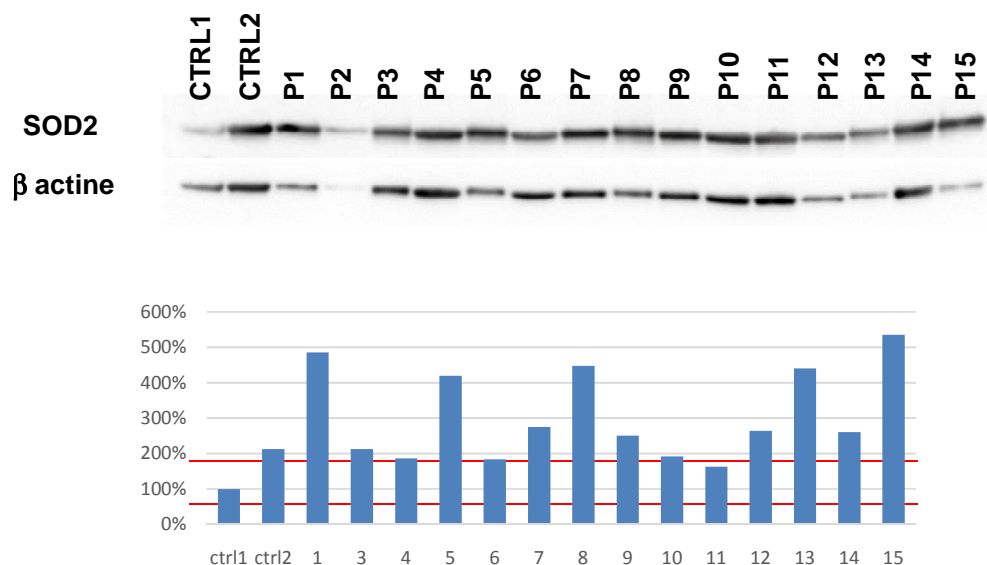


Figure 46 : Expression de la superoxyde dismutase 2 (SOD2) dans les fibroblastes de patients.
ctrl=cellules contrôles; les résultats sont normalisés par la β actine et exprimés en % par rapport au contrôle 1 (ctrl1); la barre de l'histogramme indique la valeur observée sur le blot montré ; la zone correspondant à la dispersion des valeurs contrôles est délimitée par les traits rouges.

qui a conduit à des difficultés de la quantification. Il sera nécessaire de confirmer ces données sur des membranes avec une plus grande quantité de protéines.

La SOD 2 a, quant à elle, été étudiée une seule fois car nous avons eu des difficultés pour retrouver un anticorps fonctionnant bien, celui utilisé jusqu'à présent dans l'équipe n'étant plus disponible. Les résultats de cette expérience sont montrés dans la Figure 46. Le patient 2 a de nouveau été exclu de l'analyse car son signal d'actine était trop faible. Neuf populations cellulaires présentaient une augmentation du niveau d'expression de SOD2 (P1, P5, P7, P8, P9, P12 à P15) par rapport aux valeurs observées chez les deux contrôles. Cette première expérience sera vérifiée prochainement. Cependant, elle montre déjà que la SOD2 intervient plus dans les défenses antioxydantes que la PRDX3 chez nos cellules déficitaires. Il faut noter aussi que, pour l'instant, une seule population cellulaire (P7) est commune aux cellules avec augmentation du signal SOD2 et à celles présentant une augmentation de la production d'anion superoxyde (P2, P3, P7, P10 et P11). Au vu de la fonction de la SOD2 dans la détoxification de l'ion superoxyde, il sera intéressant, après répétition des expériences, de voir si cette discordance persiste.

c) Présence de dommages oxydatifs sur les protéines cellulaires

Le stress oxydant résultant du déséquilibre entre production et neutralisation des ERO, le paramètre qui pourrait apparaître comme le plus pertinent est l'accumulation de dommages oxydatifs sur les composants cellulaires. Il existe plusieurs méthodes pour apprécier ces dommages oxydatifs. Nous avons testé deux méthodes évaluant les adduits oxydatifs des protéines cellulaires : la présence de dérivés carbonyles par la technique dite de l'oxyblot et celle de nitrotyrosines. Dans ces deux cas, l'immunoréaction révèle de nombreuses bandes dont l'identité protéique est inconnue. La quantification du signal est donc faite sur une région de la membrane plus ou moins étendue en fonction de l'intensité du signal mais évidemment commune à tous les échantillons de la membrane.

(1) *Quantification des nitrotyrosines*

Le signal obtenu avec l'anticorps dirigé contre les nitrotyrosines était faible et le bruit de fond était donc important (Figure 47). Nous avons choisi de ne quantifier que la partie supérieure de la membrane où les bandes étaient les plus distinctes. Dans cette unique expérience, aucune des populations de fibroblastes déficitaires ne présentait d'accumulation de nitrotyrosines à un niveau supérieur à celui observé dans les deux cellules contrôles utilisées dans cette expérience. Il sera nécessaire de refaire l'analyse avec un plus grand

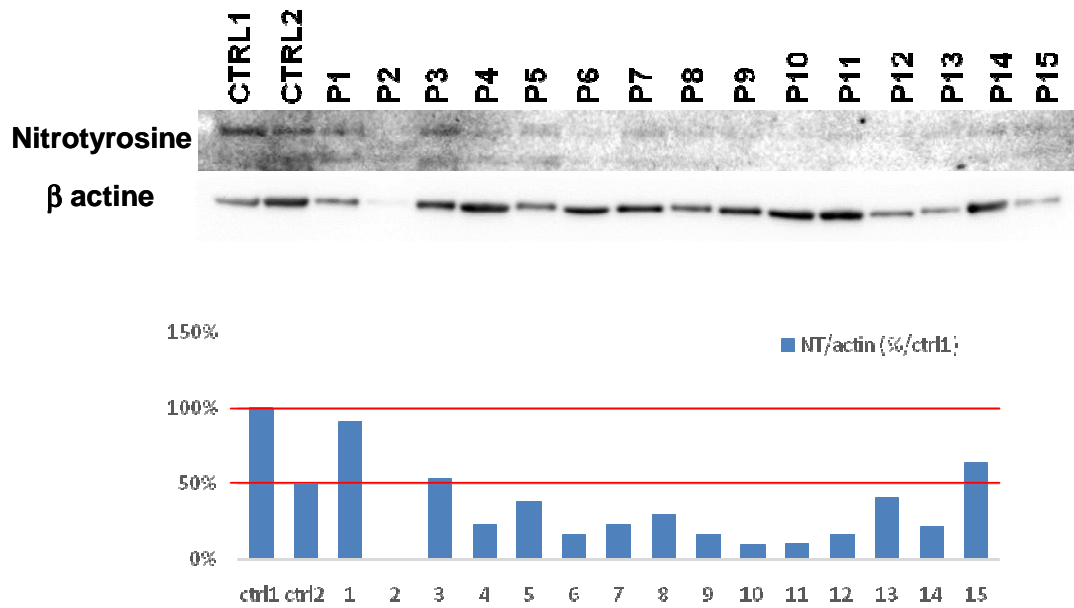


Figure 47 : Recherche de la présence de nitrotyrosines dans les fibroblastes déficitaires.
ctrl=cellules contrôles; les résultats sont normalisés par la β actine et exprimés en % par rapport au contrôle 1 (ctrl1); la barre de l'histogramme indique la valeur observée sur le blot montré ; la zone correspondant à la dispersion des valeurs contrôles est délimitée par les traits rouges.

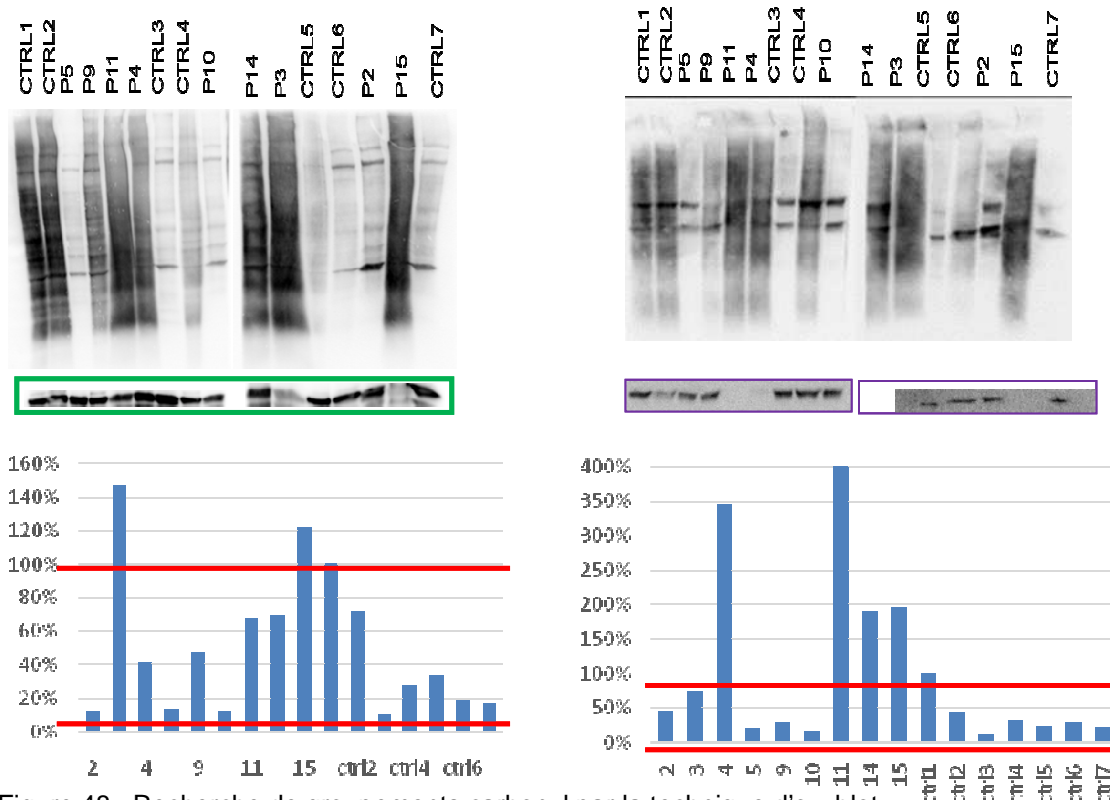


Figure 48 : Recherche de groupements carbonyl par la technique d'oxyblot
Quantification après normalisation par la porine (encadrée en vert) pour les extraits de culot mitochondrial (à gauche) ou par la tubuline (encadrée en violet) pour les protéines cytosoliques (à droite) ; valeurs exprimées en % par rapport au contrôle 1 (ctrl1); la zone correspondant à la dispersion des valeurs contrôles est délimitée par les traits rouges.

nombre de contrôles mais cette observation va dans le sens d'un contrôle efficace par les cellules de leur stress oxydant.

(2) *Quantification des groupements carbonyles*

La détection des groupements carbonyle par la méthode de l'oxyblot doit être effectuée sur des cellules vivantes de façon à en préparer une fraction mitochondriale et une fraction cytosolique dont les groupements carbonyles sont dérivés avec la dinitrophénylhydrazine (DNPH) avant congélation. Il est possible, mais moins fiable, de dériver les groupements carbonyles sur des prélèvements congelés. Il s'est donc passé beaucoup de temps entre l'obtention des différents échantillons et leur analyse sur gel car il a fallu faire pousser successivement les différentes lignées cellulaires. La quantité déposée de chaque échantillon a été contrôlée avec le signal de la porine pour les extraits mitochondriaux et de la β tubuline pour les extraits cytosoliques. Deux expériences ont été effectuées. Celle impliquant le plus d'échantillons est montrée dans la Figure 48.

Ces expériences n'ont pas donné de résultats concluants. En effet, le signal de la porine ou de la tubuline s'est révélé très faible pour un certain nombre d'échantillons. Cette diminution était expliquée par la dégradation des échantillons si l'on en juge par l'absence de bandes reconnaissables. C'est le cas notamment pour les échantillons P3 et P15 pour les extraits mitochondriaux et P3, P4, P11 et P15 pour les échantillons cytosoliques. La quantité trop importante de groupements carbonyles de ces échantillons est clairement un artéfact lié à la baisse de la protéine témoin de charge. La dégradation des échantillons a pu se produire durant la préparation des échantillons ou plus probablement durant leur long stockage à -80°C.

Par ailleurs, les cellules contrôles montrent clairement de très grandes variations du signal oxyblot, aussi bien mitochondrial que cytosolique, qui ne sont pas en rapport avec leur quantité sur le gel mais reflètent très probablement leur niveau plus ou moins important de sénescence. Cette variabilité est un obstacle important pour l'évaluation du niveau « normal » de groupements carbonyles.

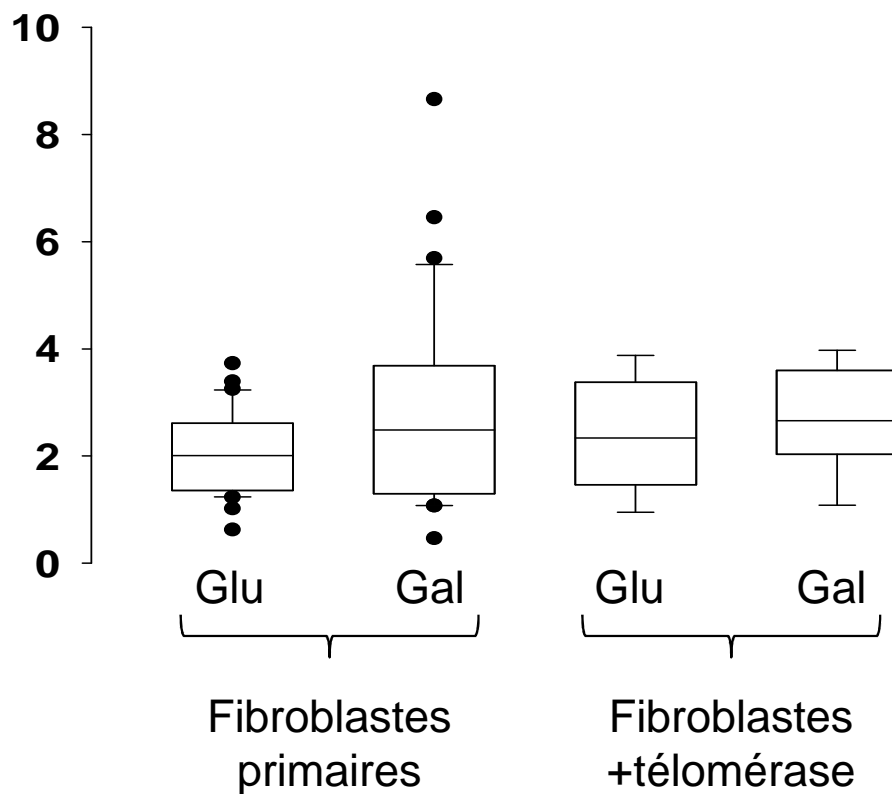


Figure 49 : Temps de doublement des cellules contrôles
Fibroblastes primaires (n=33) et fibroblastes immortalisés (n=8) ont un temps de doublement médian un peu plus élevé sous galactose mais cette différence n'atteint pas la significativité (p=0,2 pour les deux types de fibroblastes).

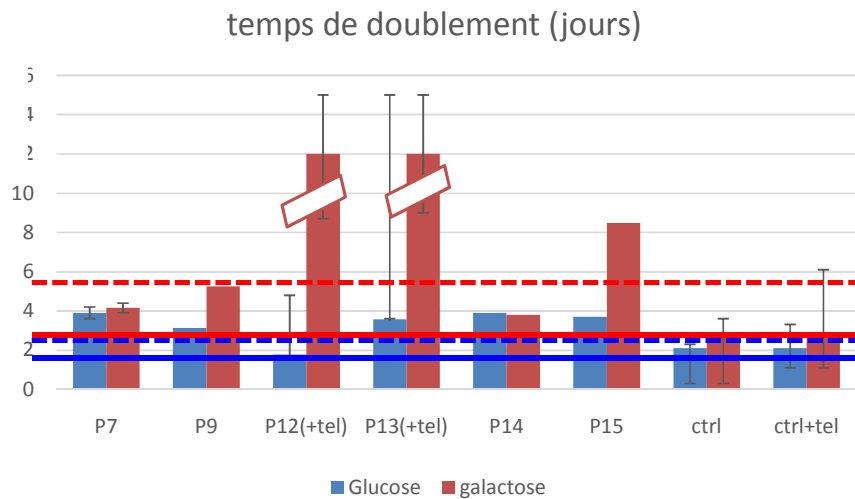


Figure 50 : Temps de doublement cellulaire
ctrl : contrôles fibroblastes primaires (n=33) ; ctrl+tel: contrôle fibroblastes immortalisés (n=8) ; Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm 95^{\text{ième}}$ et $5^{\text{ième}}$ centile pour les contrôles et en moyenne, maximale et minimale pour les échantillons de patients; les échantillons sans barre ont été analysés une seule fois. Les barres horizontales indiquent la valeur du $95^{\text{ième}}$ centile des cellules contrôles primaires (trait plein) ou immortalisées (trait pointillé) sous glucose (barres bleues) ou galactose (barre rouge).

6. Impact sur le temps de doublement et la survie cellulaire

a) Temps de doublement cellulaire

L'analyse du temps de doublement cellulaire a été effectuée pour quatre lignées de fibroblastes primaires et deux lignées de fibroblastes immortalisés par la sous-unité catalytique de la télomérase. Deux conditions ont été utilisées : en présence de 1g/l de glucose correspondant aux conditions physiologiques des cellules ou en présence de 1g/l de galactose qui induit une diminution de la production d'ATP glycolytique et teste donc la capacité de production oxydative d'ATP des cellules.

Les cellules contrôles, primaires ou immortalisées, ont un temps de doublement qui ne diffère pas significativement selon la présence de glucose ou de galactose dans le milieu de culture (Figure 49).

Les quatre populations de fibroblastes primaires étudiées (P7, P9, P14 et P15) avaient un temps de doublement au dessus du 95^{ième} centile des contrôles aussi bien sous glucose que sous galactose. Les populations P9 et surtout P15 augmentaient de façon importante leur temps de doublement lorsqu'elles étaient cultivées en présence de galactose (Figure 50).

Les deux populations immortalisées par la télomérase présentaient un temps de doublement supérieur à 10 jours sous galactose. Elles arrêtaient en fait quasiment leur prolifération et parfois mouraient. Sous glucose, la population P12 présentait un temps de doublement quasiment normal mais la population P13 gardait un temps très augmenté au 95^{ième} centile des contrôles (Figure 50).

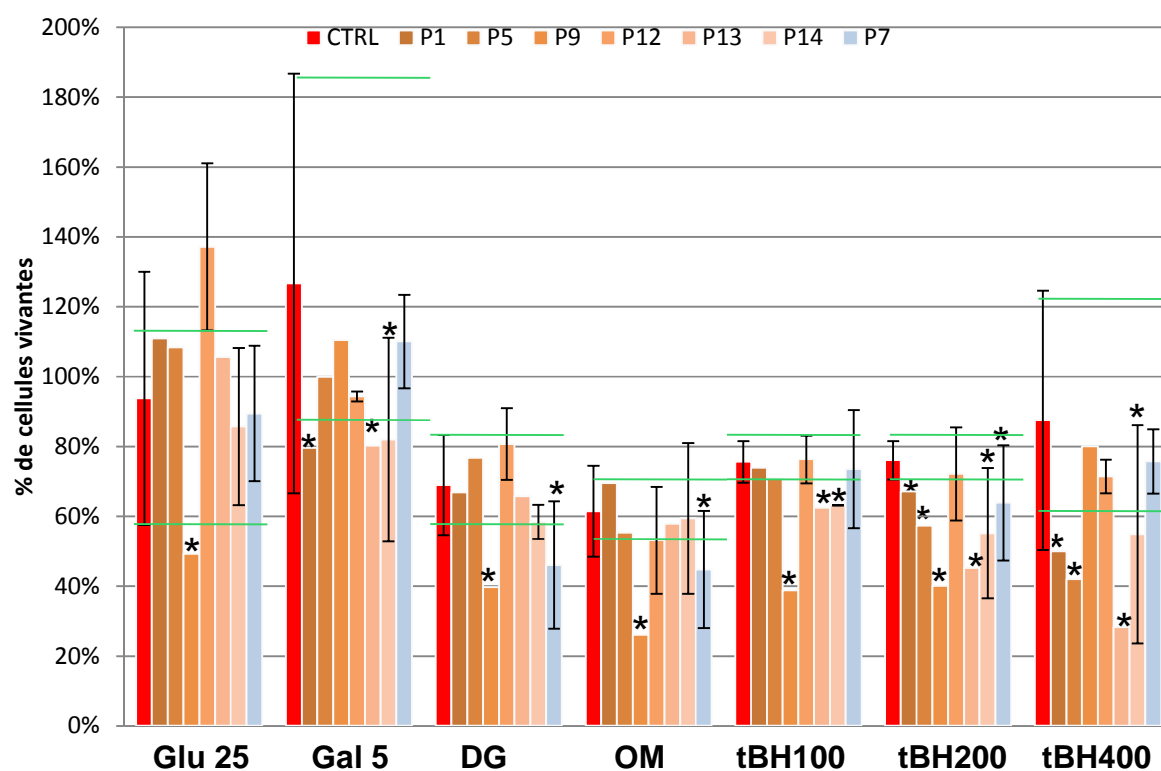


Figure 51 : Test de survie cellulaire après stress métabolique et oxydatif
CTRL : valeurs contrôles exprimées en moyenne \pm écart type ; Glu25 : glucose 25 mM;
Gal5 : galactose 5 mM ; DG = déoxyglucose 10 mM, OM = oligomycine 1 μ M, tBH = tert
butyl hydroperoxyde (100, 200 ou 400 μ M).
* valeurs en dehors de la zone du 5^{ème} et du 95^{ème} centile (traits verts)
Les déficits isolés en complexe III sont représentés dans les nuances orangées et les
déficits en complexe IV dans les nuances bleues.

b) Survie cellulaire après stress métabolique et oxydatif

Une autre façon d'étudier les capacités d'adaptation énergétique des cellules est de détecter le pourcentage de cellules ayant survécu après incubation dans différentes conditions de stress métabolique et oxydatif. Différentes conditions ont été testées : forte concentration en glucose (25 mM), réduction de la glycolyse (partielle par incubation en présence de galactose durant 48 heures, complète par le déoxyglucose pendant 15 heures), arrêt de la synthèse oxydative d'ATP par incubation avec de l'oligomycine et stress oxydatif exogène par incubation avec diverses concentrations de tert-butyl-hydroperoxide, peroxyde organique couramment utilisé comme source de radicaux libres. Les données, exprimées en % des cellules vivantes en présence de glucose 1 g/L, sont résumées dans la Figure 51. Sept populations cellulaires ont été étudiées : six présentant un déficit isolé en complexe III (P1, P5, P9 et P14 en lignées primaires et P12, P13 en lignées immortalisées) et une un déficit isolé en complexe IV (P7, lignée primaire).

Pour les conditions de stress énergétique, seuls les fibroblastes P9 sont en nombre significativement diminué par rapport aux cellules contrôles lorsqu'ils sont incubés en présence de 25 mM de glucose. Quatre des lignées étudiées montrent une réduction significative du nombre des cellules par rapport aux cellules contrôles lorsqu'elles sont incubées pendant 48 heures en présence de galactose ; ce sont les populations cellulaires : P1, P12, P13 et P14. En présence de déoxyglucose entraînant une diminution totale de la glycolyse ou d'oligomycine induisant l'arrêt de la synthèse oxydative d'ATP, seules deux lignées se démarquent significativement : P9 et P7.

Pour les conditions d'induction d'un stress oxydant exogène, seules deux lignées, P9 et P13, montrent une diminution significative du nombre de cellules survivantes après incubation avec la concentration minimale de tert-butyl-hydroperoxide à 100 μ M. Avec la concentration moyenne de 200 μ M tert-butyl-hydroperoxide, cinq des sept lignées résistent moins que les cellules contrôles ; trois significativement et deux avec des valeurs de p proches de la significativité. Enfin, à forte concentration de tert-butyl-hydroperoxide (400 μ M), toutes les lignées, à l'exception d'une, ont une diminution significative du nombre de cellules vivantes par rapport aux cellules contrôles. Il est toutefois surprenant que la seule lignée n'ayant pas montré de sensibilité soit P9 qui était très sensible aux différents stimuli, notamment à des doses inférieures de tert-butyl-hydroperoxide ; cette donnée devra être confirmée lors de manipulations ultérieures.

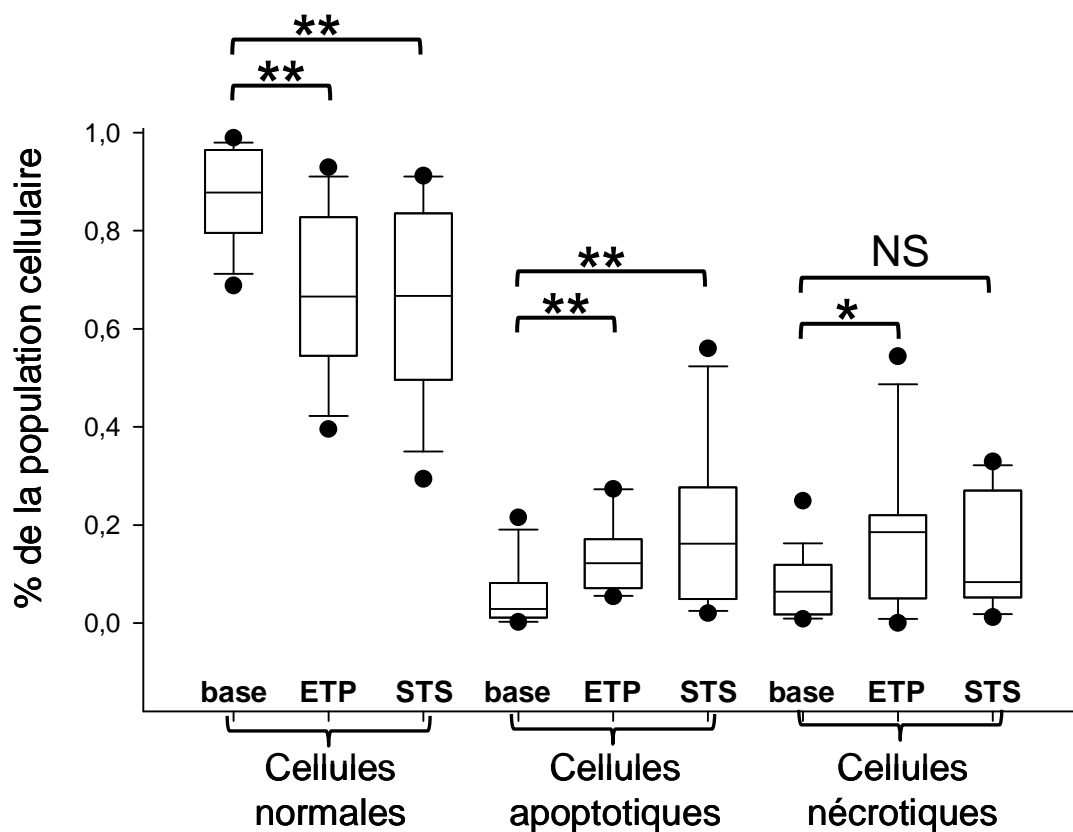


Figure 52 : Test de réponse au stress pro-apoptotique

Valeurs obtenues dans des cellules contrôles; la baisse de la proportion de cellules normales et l'augmentation de la proportion de cellules apoptotiques sont significatives sous traitement par l'étoposide ou la staurosporine tandis que l'augmentation de la proportion de cellules nécrotiques est à la limite de la significativité sous étoposide et n'est pas significative sous staurosporine; ** $p \leq 0,01$ et * $p < 0,05$ par rapport aux cellules contrôles à l'état basal.

En conclusion, les lignées déficitaires semblent toutes présenter, à des degrés variables, une sensibilité anormale au stress oxydatif exogène. Il est aussi intéressant de noter que la condition la plus efficacement discriminante après le stress oxydant exogène est l'incubation en présence de galactose pendant 48 heures ce qui souligne l'importance de la glycolyse pour la survie de ces populations cellulaires. L'incubation en présence de déoxyglucose est moins discriminante ; cela pourrait être rapporté à deux possibilités opposées. L'une est que cette condition est déjà mal supportée par les cellules contrôles, l'autre est que la courte durée d'incubation (15 heures) ne permet pas une mort cellulaire suffisante.

c) Sensibilité à l'apoptose

La propension des cellules à entrer en apoptose ou en nécrose a été analysée en cytométrie en flux par le marquage avec de l'annexine V fluorescente qui se fixe sur les phosphatidylsérines exposées à la surface externe des membranes de cellules apoptotiques. La nécrose cellulaire était en parallèle appréciée par la coloration à l'iodure de propidium qui ne pénètre pas dans les cellules intactes, à savoir normales ou au stade précoce de l'apoptose. Ce double marquage permet donc de distinguer trois populations cellulaires : normale sans marquage par l'iodure de propidium ou l'annexine V, apoptotique avec marquage par l'annexine V mais pas par l'iodure de propidium, et nécrotiques avec marquage par l'iodure de propidium uniquement.

Les cellules ont été étudiées dans leurs conditions basales de culture dans du milieu contenant 1 g/L de glucose et dans deux conditions pro-apoptotiques induites par une incubation en présence de 1 μ M staurosporine, inhibiteur de la protéine kinase C, ou de 400 μ M étoposide, inhibiteur de la topoisomérase II. Onze lignées ont été analysées : sept déficits isolés en complexe III (P1, P5, P8, P9, P12, P13, P14), trois déficits isolés en complexe IV (P6, P7, P15) et un déficit combiné (P3).

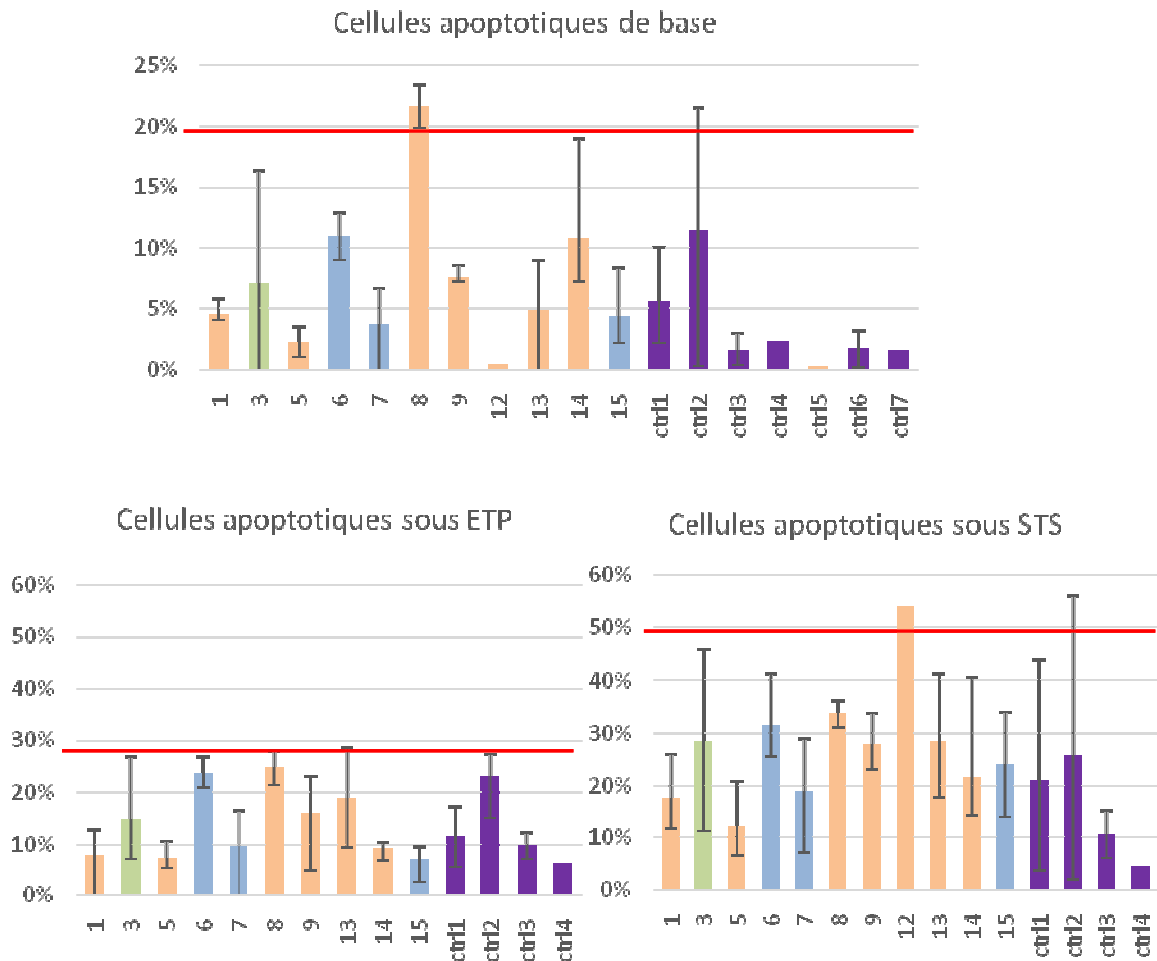


Figure 53 : Proportion de cellules apoptotiques dans les différentes conditions testées

ctrl : cellules contrôles; les barres rouges indique le 95^{ième} centile des valeurs observées dans les cellules contrôles dans les mêmes conditions; les barres d'erreur indiquent la valeur maximale et minimale observée pour chaque échantillon déficitaire ou contrôle; les échantillons analysés une seule fois n'ont pas de barre d'erreur.

Les déficits isolés en complexe III sont représentés en orange, les déficits isolés en complexe IV en bleu et les déficits combinés complexe III et IV en vert. Les contrôles sont représentés en violet

(1) Validation du protocole d'analyse

Nous avons obtenu 17 déterminations indépendantes sur 7 populations contrôles différentes étudiées à l'état basal, et 11 déterminations indépendantes sur 4 populations contrôles différentes pour chacune des conditions d'induction d'un stress apoptotique. L'ensemble des données obtenues est représenté sur la Figure 52.

Les deux conditions de stress pro-apoptotiques induisaient dans les cellules contrôles une augmentation des cellules apoptotiques (marquées par l'annexine V mais pas par l'iodure de propidium) et une baisse des cellules normales. L'augmentation des cellules nécrotiques (marquées par l'iodure de propidium) était juste significative ($p=0,045$) sous étoposide et n'était pas significative sous staurosporine. Les comparaisons entre groupes étaient effectuées par le test non paramétrique de Mann et Whitney.

(2) Analyse des cellules déficitaires

Dans les cellules déficitaires analysées en tant que groupe, le pourcentage de cellules en apoptose n'était pas significativement différent de celui des cellules contrôles quelle que soit la condition étudiée (5,7%, 10,5% et 23,5% dans le groupe déficitaire contre 2,8%, 12,2% et 16,2% dans les cellules contrôles à l'état basal, sous étoposide et sous staurosporine). Le pourcentage de cellules nécrotiques était par contre significativement élevé dans les trois conditions étudiées (15,5%, 27,9% et 27,9% contre 6,4%, 15,5% et 18,5% à l'état basal, sous étoposide et sous staurosporine, $p=0,002$, 0,018 et 0,018 respectivement avec le test de Mann et Whitney). La proportion de cellules normales était, quant à elle, significativement anormale uniquement dans les conditions de base (67,4% pour les cellules avec déficit contre 87,2% pour les cellules contrôles, $p=0,003$ avec le test de Mann et Whitney).

Ces données globales recouvrent une situation hétérogène à l'échelle des populations individuelles (Figure 53). Seule la lignée de P8 présentait un pourcentage de cellules apoptotiques significativement élevé (au-dessus du 95^{ème} centile des valeurs contrôles) à l'état basal. Seule la lignée P12 montre une sensibilité anormalement importante à la staurosporine.

En conclusion, la plupart des cellules déficitaires montraient des chiffres relativement élevés de cellules en apoptose de base comme sous traitement. Ces chiffres élevés n'atteignaient cependant la limite de la significativité que pour deux des populations

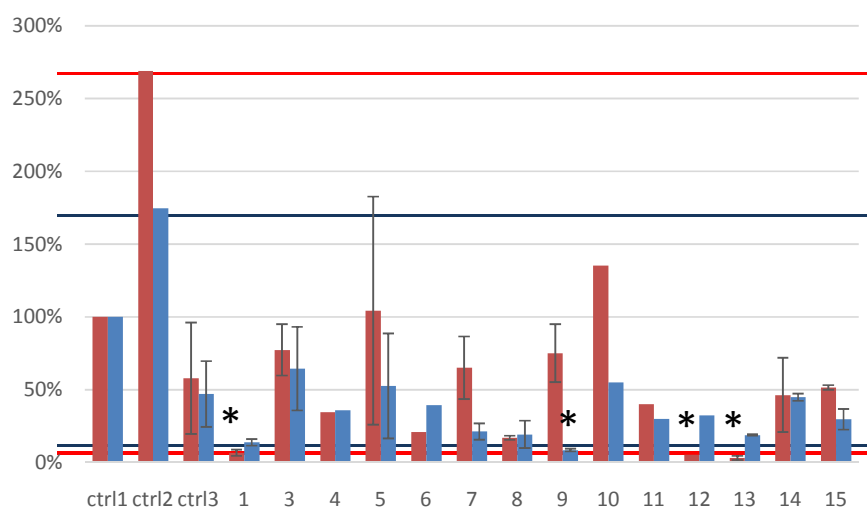
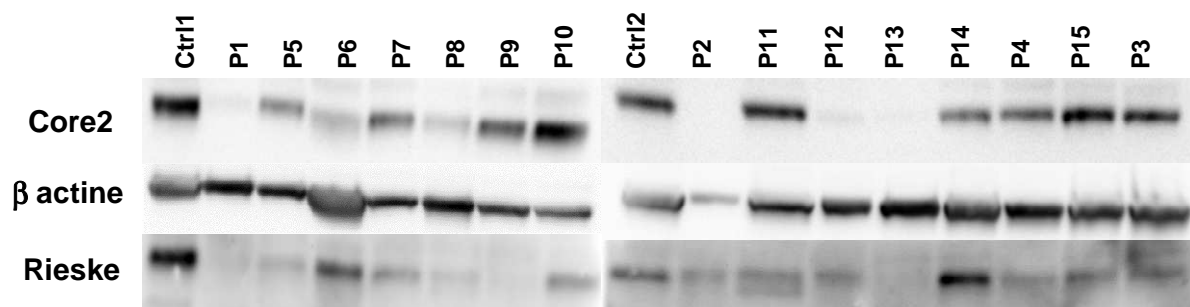


Figure 54 : Expression des sous-unités core 2 et Rieske du complexe III
 A: Exemple d'immunomarquage; B: histogramme de la quantification des deux sous-unités, barres rouges=core2, barres bleues=ISP; les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle 1 après normalisation par la β actine; les barres des échantillons marquent leur valeur maximale et minimale tandis que les lignes horizontales marquent les valeurs maximales et minimales observées chez les contrôles (rouges pour core 2 et bleues pour ISP); les astérisques signalent les valeurs en dessous de la minimale des contrôles.

déficitaires. Cette absence de significativité doit être relativisée. D'une part les écarts des valeurs parfois très importants pour une même population cellulaire montrent la difficulté de contrôle de la méthode (délais d'obtention des cellules, conditions de culture...), d'autre part les contrôles sont eux-mêmes très variables et le contrôle 2 notamment, étudié entre 3 et 4 fois selon la condition, fait considérablement monter les normes. Il est donc nécessaire d'augmenter la validité de nos contrôles en obtenant, pour chacun des contrôles, un nombre identique de valeurs indépendantes. Il serait également important d'analyser l'apoptose par d'autres méthodes. Nous avons essayé pour l'instant l'analyse de la caspase 3 clivée par western blot et la mesure de la mort cellulaire sous traitement plus long par l'étoposide et la staurosporine. Ces deux méthodes se sont révélées très peu sensibles.

7. Recherche de la cause génétique des déficits

a) Composition du complexe III

Une stratégie de recherche de la cause des déficits est l'analyse de la composition du complexe lui-même cherchant à établir des profils d'altérations évocateurs d'une cause. Par exemple, la conservation des sous-unités ajoutées dans la première partie de l'assemblage du complexe III permet de s'orienter vers des anomalies soit de l'assemblage tardif, soit des sous-unités ajoutées à ce stade.

Nous avons donc analysé par western blot l'état à l'équilibre de deux sous-unités du complexe III : la protéine core 2 (codée par le gène *UQCRC2*), de masse moléculaire de 43 kDa, impliquée dans la formation précoce du complexe III, et la protéine de Rieske (codée par le gène *UQCRFS1*), de masse moléculaire 30 kDa, assemblée de façon tardive dans le complexe III. Les résultats ont été normalisés par la quantité de la β actine car ces analyses ont été effectuées sur homogénats cellulaires. La comparaison des différentes membranes a été faite grâce à la normalisation des résultats sur la moyenne des valeurs obtenues pour un échantillon contrôle présent sur chaque membrane (Figure 54).

Toutes les populations cellulaires ont été analysées par cette méthode. Toutefois seules les lignées des patients P1, P3, P5, P7, P8, P9, P13, P14 et P15 ont été analysées deux fois. La lignée P2 n'a pas pu être quantifiée car la quantité déposée était trop faible. La quantité de la sous-unité core 2 apparaissait diminuée dans huit populations cellulaires ($\leq 50\%$ de la valeur du contrôle 1 pour les lignées P1, P4, P6, P8, P11, P12, P13 et P14). Elle était très basse pour 5 de ces lignées ($\leq 21\%$ de la valeur du contrôle 1 pour les lignées P1, P6, P8, P12, et P13).

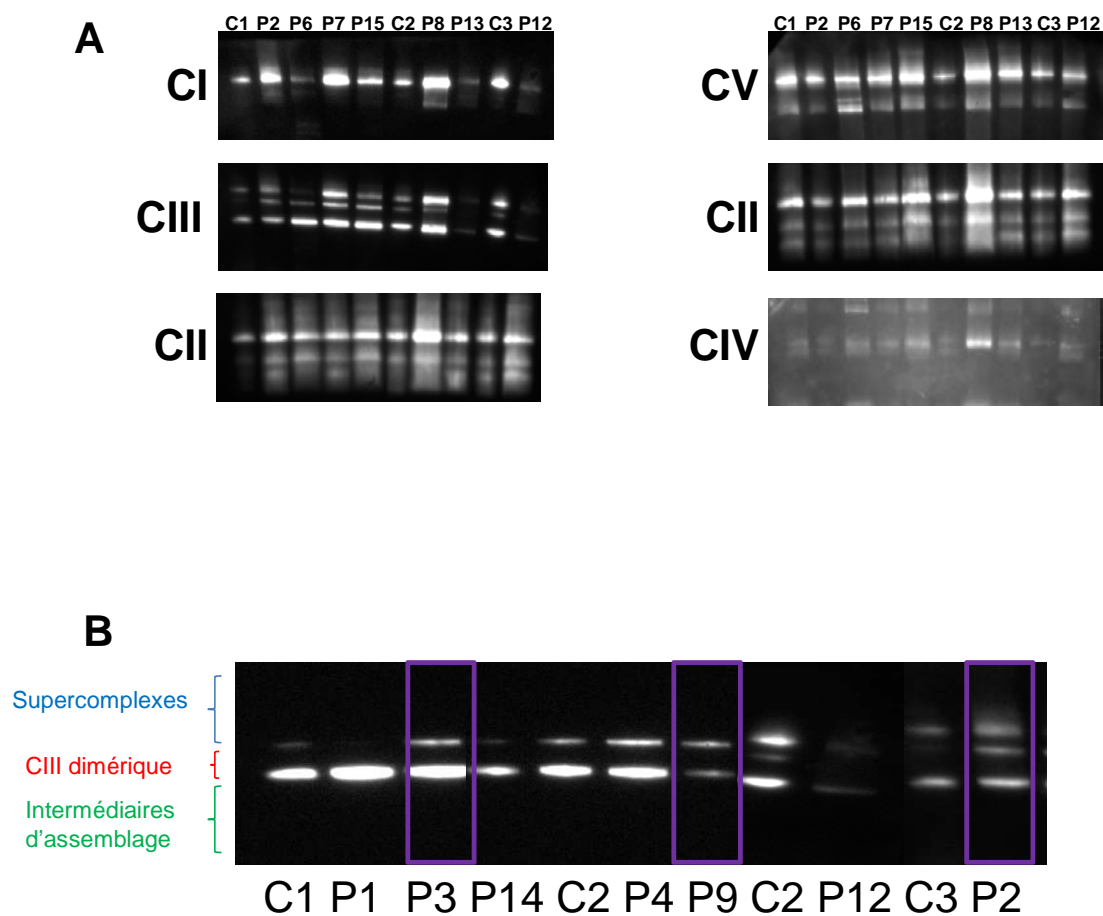


Figure 55 : Etude de l'assemblage des complexes respiratoires par électrophorèse en conditions natives (BN PAGE).

A: Exemple d'immunomarquage: CI, CII, CIII, CIV et CV = complexes I, II, III, IV et V marqués avec un anticorps contre l'une des sous-unités du complexe (ND1, 70kD, core2, CO2 et sous-unité a respectivement) ; B : Immunomarquage CIII pour les patients ayant une cause génétique identifiée. P1: *UQCRB* ; P2 et P3 : *BCS1L* ; P4 et P14 : *MT-CYB* ; P9 : *LYRM7* et P12 : *CYC1*. Les cadres violets montrent les patients ayant une mutation sur gène codant pour un facteur d'assemblage (*BCS1L* et *LYRM7*).

La quantité de la sous-unité Rieske apparaissait diminuée pour onze lignées (P1, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P13 et P15). Elle était très basse pour 5 lignées ($\leq 21\%$ de la valeur du contrôle 1 pour les lignées P1, P7, P8, P9 et P13).

Parmi les populations présentant une diminution très importante de l'une des sous-unités du complexe III étudiées, on pouvait donc distinguer un groupe où les deux sous-unités étaient très abaissées. Ce groupe comprend les lignées P1, P8, et P13, parmi lesquelles P1 portaient des mutations du gène *UQCRB*.

Les lignées P6 et P12 présentaient une diminution très importante de core 2 et une diminution un peu moins importante de Rieske. L'individualisation de ce groupe par rapport au précédent doit cependant être prise avec précaution à cause du signal faible obtenu avec l'anticorps dirigé contre Rieske qui peut induire une plus grande incertitude de quantification.

Un troisième groupe pouvait être individualisé associant une baisse importante de la protéine Rieske avec une quantité normale de core2. Il comprenait les lignées P7 et P9 avec une quantité de Rieske à 21 et 9% du contrôle 1 contrastant avec une quantité de core 2 à 65 et 75% respectivement. Ce dernier groupe est donc évocateur de défaut tardif de l'assemblage du complexe III.

b) Etude par électrophorèse en conditions natives

La technique d'électrophorèse en conditions natives (Blue-Native-PAGE) permet d'étudier la quantité des différents complexes respiratoires ainsi que leur assemblage. Des exemples d'immunomarquage sont présentés dans la Figure 55 et la quantification de l'ensemble des données est exposée dans la Figure 56. Les signaux des complexes I, III, IV et V ont été normalisés par le signal du complexe II puis ces rapports ont été exprimés en % d'un contrôle commun à toutes les membranes. Cette analyse n'a pas été réalisée deux fois pour chacune des lignées. Elle a essentiellement été effectuée sur préparations de cellules totales et non sur mitochondries isolées.

L'analyse par BN-PAGE a tout d'abord permis d'estimer la quantité des complexes I et V dont le dosage spectrophotométrique n'a pas été fait dans les cellules du fait de la nécessité de le faire sur préparations de mitochondries et donc à partir d'un grand nombre de cellules. La quantité de complexe I apparaît basse pour plusieurs lignées (P1, P3, P5, P6, P9 à P14). Le complexe V apparaissait quant à lui le plus souvent normal, en dessous du minimum des contrôles uniquement pour les lignées P1 et P9. La lignée P1 est porteuse de mutations d'*UQCRB* dont on attend des conséquences exclusivement sur le complexe III. L'observation

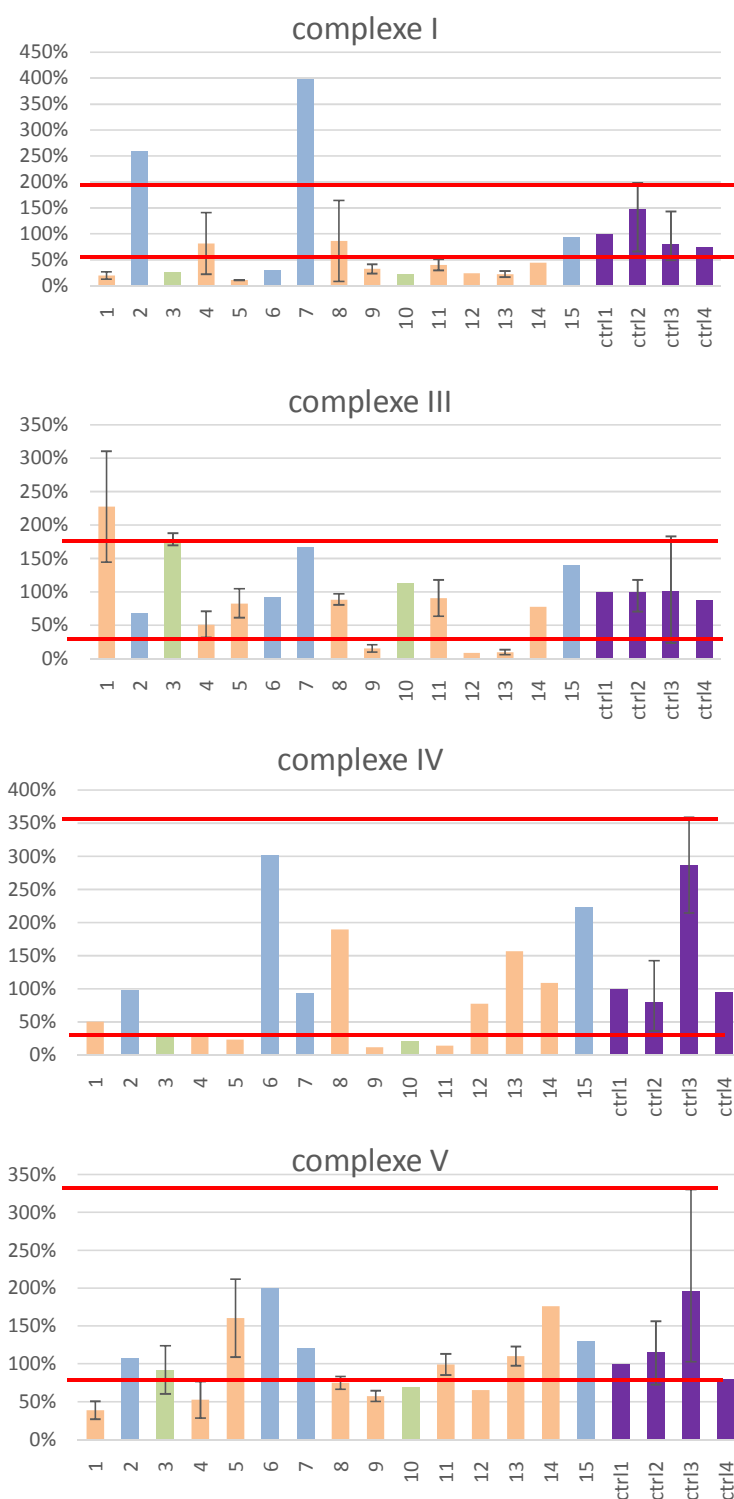


Figure 56 : Quantification des différents complexes respiratoires par BN PAGE. Le signal de chacun des complexes a été normalisé par le signal du complexe II sur la même membrane puis exprimé en % du rapport au contrôle 1 présent dans chaque membrane. Le nombre d'analyses des différents contrôles est de 5, 5, 3 et 1 pour les contrôles 1, 2, 3 et 4 respectivement; les échantillons déficitaires ont été analysés une ou deux fois; les barres d'erreur indiquent les valeurs maximale et minimale de chaque échantillon. Les déficits isolés en complexe III sont représentés en orange, les déficits isolés en complexe IV en bleu et les déficits combinés complexe III et IV en vert. Les contrôles sont représentés en violet

de baisse associée du complexe I dans ce cadre est cependant en accord avec l'observation faite précédemment dans l'équipe de l'effet pléiotrope des déficits d'un seul complexe respiratoire {Marsy, 2008}.

L'analyse du complexe III n'a pas montré d'intermédiaires d'assemblage dans aucun des échantillons même P2 et P3 connus comme porteurs de mutation du gène *BCS1L* (Figure 55B). La quantité du complexe III complètement assemblé n'apparaissait réduite de façon très importante que pour les lignées P9, P12 et P13.

L'immunodétection du complexe IV n'était pas optimale et les résultats de la quantification du complexe IV doivent donc être pris avec précaution (Figure 56). Les lignées P3, P4, P5, P9, P10 et P11 présentaient une quantité de complexe IV inférieure à la valeur minimale observée chez les contrôles. P4 et P5 parmi ces lignées ne présentaient pas de déficit de l'activité du complexe IV en spectrophotométrie ce qui souligne le caractère fragile de l'observation en BN PAGE.

En conclusion, l'analyse par BN PAGE du complexe III a confirmé la baisse du complexe suggérée par la baisse importante et combinée des sous-unités core2 et Rieske dans deux populations cellulaires : P12 et P13. Elle ne l'a pas confirmé pour les lignées P1, P6 et P8. De façon surprenante, les lignées avec une quantité normale de core 2 mais une diminution importante de Rieske n'ont pas montré d'intermédiaire d'assemblage. De plus, elles présentaient une quantité de complexe III normalement assemblé qui était soit normale (P7) soit diminuée (P9). Il apparaît donc nécessaire d'améliorer la technique de BN PAGE en essayant d'autres anticorps et en testant d'autres préparations des mêmes cellules.

c) Identification de gènes candidats par séquençage direct

La recherche de l'altération génétique causale a tout d'abord été effectuée par séquençage systématique de gènes candidats dans les 15 lignées cellulaires. Ces gènes codent pour cinq sous-unités du complexe III (*CYCI*, *MT-CYB*, *UQCRFS1*, *UQCRB* et *UQCRCQ*) et un code pour un facteur d'assemblage du complexe III (*BCS1L*). Cette approche nous a permis de confirmer quatre mutations déjà connues (deux sur *BCS1L*, une sur *UQCRB* et une sur *MT-CYB*) et d'identifier deux nouvelles mutations (une sur *CYCI* et une sur *MT-CYB*). Les différentes mutations sont répertoriées dans le Tableau 12.

Gène	Fonction de la protéine	Patient	Mutations	Type	Score
<i>CYC1</i>	Sous-unité catalytique	P12	c.643C>T, p.Leu215 Phe	Faux-sens Homozygote	7/8
<i>UQCRFS1</i>	Sous-unité catalytique	/	0	/	/
<i>MT-CYB</i>	Sous-unité catalytique	P4	m15498 G>A, p.Gly251Asp ¹ m.15152 G>A, p.Gly136Ser	Faux-sens Homoplasmique	1/6
		P14		Faux-sens Homoplasmique	2/6
<i>UQCRB</i>	Sous-unité de structure	P1	c.del_338-341 p.Arg105LysFs*22 ²	Frameshift Homozygote	Protéine tronquée
<i>UQCRQ</i>	Sous-unité de structure	/	0	/	/
<i>BCS1L</i>	Facteur d'assemblage	P2	c.296C>T, p.Pro99Leu ³ c.830G>A p.Ser277Asn ⁴	Faux-sens Homozygote	8/8
		P3		Faux-sens Homozygote	8/8
<i>LYRM7</i>	Facteur d'assemblage	P9	c.52A>delA, p.Arg18Aspfs*12	Frameshift Homozygote	Protéine tronquée

Tableau 12 : Mutations pathogènes identifiées

Score = score de pathogénicité établi à partir de logiciels de prédiction : Polyphen 2, SIFT, Mutation taster et GVGD, plus le score est haut plus la mutation est probablement délétère. Pour chaque logiciel, un score de 2 est donné pour une mutation probablement pathogène, 1 pour une possiblement pathogène et 0 pour une non –pathogène.

Quatre fibroblastes étaient porteurs de mutations connues au début de l'étude, soit car ils provenaient de patients publiés ¹:(Haut, Eur J Hum Genet, 2004), ²:(Haut, Human Genet, 2003); ⁴(Delonlay, Nature Genetics, 2001), soit parce que les mutations avaient été identifiées lors du diagnostic clinique ³(séquence effectuée dans le service de Biochimie du Kremlin Bicêtre par le Dr Slama).

(I) *CYCI* (NM-001916.3)

Ce gène code pour une sous-unité catalytique du complexe III. Plusieurs mutations ont été retrouvées dans plusieurs lignées mais elles ont pu être facilement classées comme des polymorphismes (fréquence dans les bases de données, localisation intronique...). Le patient P12 présentait une mutation faux-sens c.643C>T, p.Leu215Phe à l'état homozygote qui étaient considérée délétère par les quatre logiciels de prédiction utilisés en pratique génétique clinique.

L'étude de la ségrégation familiale de la mutation a été réalisée dans l'équipe grâce aux lignées lymphoblastoïdes établies pour les parents et la fratrie de la patiente. La mutation était présente à l'état hétérozygote chez les parents. Quant à la sœur et au frère de la patiente, tous deux en bonne santé, ils présentaient une séquence normale (Figure 57).

Ce patient avait été séquencé en parallèle par l'équipe du Dr Slama, hôpital de Bicêtre, la validation du caractère pathogène a donc ensuite été partagée avec plusieurs équipes (P Rustin, Hôpital Robert Debré et A Tzagoloff, New York). Ces études ont été rapportées dans un article où est également analysée une autre mutation du même gène identifiée par exome chez un patient en Australie {Gaignard, 2013 ; cf. annexe}.

Pour notre part, en dehors de la ségrégation familiale, nous avons montré par immunoblot une réduction sévère du cytochrome *c1* dans le muscle squelettique et les fibroblastes du patient. Celle-ci s'accompagnait d'une réduction de la sous-unité core2 s'assemblant avec le cytochrome *c1* durant la phase précoce d'assemblage du complexe III. Le complexe III dans son ensemble apparaissait de fait très diminué dans le muscle (western blot montrant une baisse de toutes les sous-unités étudiées, Figure 58) et dans les fibroblastes (BN PAGE Figure 55).

L'effet délétère de la mutation a également été démontré chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* dont la délétion du gène *CYCI* est compensée par la transfection avec un plasmide contenant le gène *CYCI* sauvage mais pas le gène *CYCI* porteur de la mutation. Par ailleurs, l'infection des cellules déficitaires du patient par un lentivirus codant pour l'ADN complémentaire sauvage de *CYCI* a entraîné une restauration partielle du niveau à l'équilibre du cytochrome *c1* {Gaignard, 2013}.

(2) *UQCRFS1 (NM-006003.2)*

Ce gène code également pour une sous-unité catalytique du complexe III. Aucune mutation pathogène n'a été retrouvée au sein de notre cohorte. Quelques polymorphismes, tous connus, ont été retrouvés.

(3) *MT-CYB (NC-012920.1)*

Deux mutations de *MT-CYB* ont été étudiées dans la cohorte. L'une avait été diagnostiquée par l'équipe du Kremlin-Bicêtre qui nous a fourni les fibroblastes (lignée P4) pour notre étude {Haut, 2004}. Il s'agit de la mutation m.15498 G>A, p.Gly251Asp présente à l'état homoplasmique. La mère et le frère du patient présentent la même mutation à l'état également homoplasmique et sont en bonne santé apparente. Cette mutation a été rapportée, à l'état hétéroplasmique, comme responsable d'une cardiomyopathie histiocytoïde chez un patient {Andreu, 2000}.

Une deuxième mutation, également homoplasmique, m.15152 G>A, p.Gly136Sera été mise en évidence dans la lignée P14. Là aussi cette mutation est présente, également à l'état homoplasmique, chez la mère du patient qui est en bonne santé apparente.

Dans les deux cas, les mutations ont été retenues car elles modifiaient un acide aminé conservé, n'étaient pas rapportées dans les bases de données et étaient accompagnées d'un déficit en complexe III. Il existait cependant des discordances d'interprétation du caractère délétère entre les différents logiciels. Pour la première mutation, un score de 1/6 était obtenu donc seul un logiciel la considérait comme possiblement pathogène et la deuxième obtenait seulement un score de 2/6 (Tableau 12).

Notre analyse biochimique montre la réalité du défaut du complexe III dans les deux lignées P4 et P14. Il reste cependant difficile d'affirmer le lien entre la mutation du cytochrome b et le déficit sans étude fonctionnelle complémentaire. Nous avons prévu de réaliser des cybrides pour valider fonctionnellement ces mutations. Nous souhaitons également récupérer des fibroblastes d'apparentés pour les analyser.

(4) *UQCRB (NM-006294.3)*

Ce gène code pour une sous-unité structurale du complexe III. Une délétion homozygote de 4 paires de bases dans l'exon 4 avait été identifiée par l'équipe du Kremlin-Bicêtre qui nous a fourni la lignée mutée P1 {Haut, 2003}. La mutation est responsable d'un

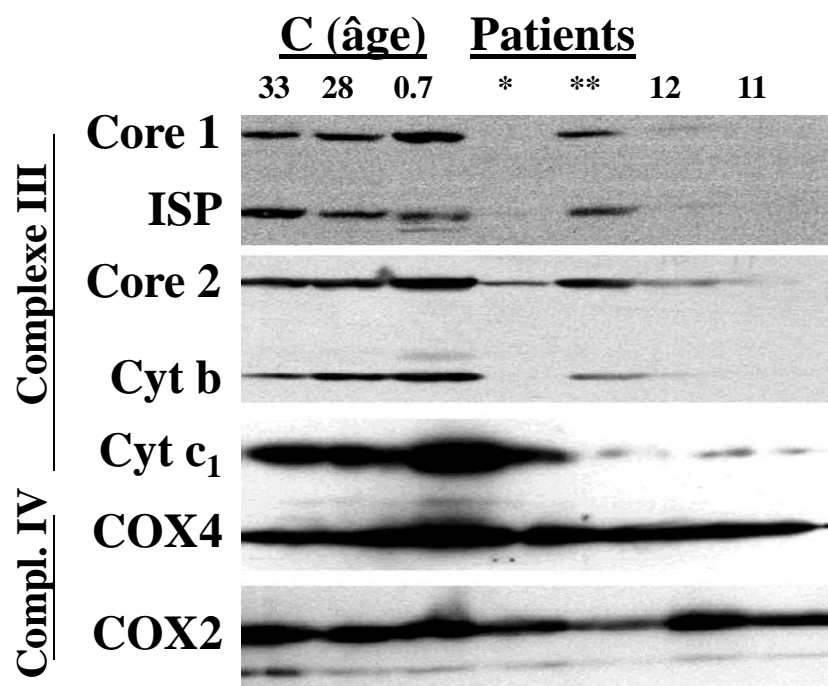


Figure 58 : Etude du complexe III par western blot dans le muscle de patients avec déficit sévère du complexe III
 Les patients * et ** étaient porteurs de mutation du cytochrome b (* = m. 15150G>A p.Trp135Stop) et ** = m.15197T>C p.Ser151Pro), 12 = muscle du patient dont est dérivée la lignée P12, 11 = muscle du patient dont est dérivée la lignée P11

décalage du cadre de lecture et entraîne un changement de 7 acides aminés à partir de l'acide aminé 105 et l'addition de 14 acides aminés supplémentaires à l'extrémité C-Ter de la protéine. Nous n'avons trouvé aucune autre mutation pathogène sur ce gène dans notre cohorte.

(5) *UQCRQ (NM-014402.4)*

Ce gène code également pour une sous-unité structurale du complexe III. Aucune mutation pathogène n'a été retrouvée au sein de notre cohorte.

(6) *BCS1L (NM-004328.4)*

Ce gène code pour le premier facteur d'assemblage du complexe III impliqué en pathologie humaine. Les deux lignées porteuses de mutations de *BCS1L* étaient identifiées dès le début de l'étude. La lignée P3 provenait de l'un des patients ayant conduit à l'identification de cette cause génétique de déficit en complexe III {de Lonlay, 2001}. Ce patient et le patient dont est issue la lignée P2 ont été suivis par le Dr Hélène Ogier à l'hôpital Robert Debré. Le diagnostic avait été fortement évoqué chez le patient P2 devant l'association de signes cliniques typiques des mutations de *BCS1L*. Il a été confirmé par le séquençage du gène dans l'équipe du Dr Slama, hôpital de Bicêtre. Les deux mutations sont rappelées dans le Tableau 12. Elles sont considérées comme pathogènes par les quatre logiciels de prédiction.

Aucune autre mutation pathogène du gène *BCS1L* n'a été trouvée dans les autres lignées.

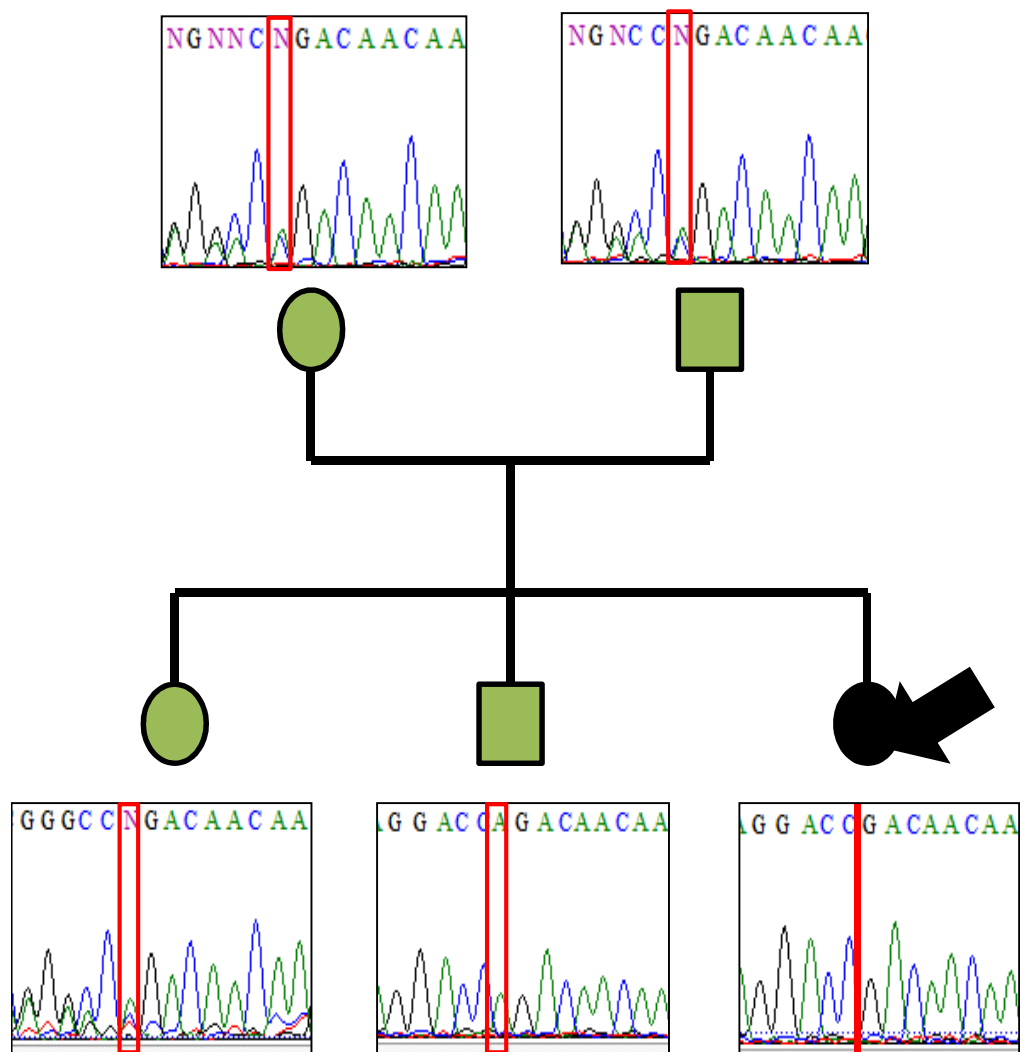
d) Séquençage de l'exome

(1) *Identification de mutations candidates*

Parallèlement à l'étude des gènes candidats, grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr Prokisch (Munich, Allemagne), nous avons pu obtenir le séquençage de l'exome pour quatre lignées cellulaires avec déficit isolé en complexe III (P5, P8, P9 et P11).

Aucune mutation directement « candidate » n'a été mise en évidence pour les lignées P5, P8 et P11). Par contre la lignée P9 présentait, au milieu d'un ensemble de 110 variations non-synonymes, deux mutations homozygotes non-sens modifiant des protéines mitochondriales clairement candidates.

L'une est une délétion homozygote d'une base, c.52_delA, p.Arg18Aspfs12*, dans l'exon 2 du gène *LYRM7*, homologue de *MZM1* chez la levure qui code pour un facteur d'assemblage du complexe III. Cette délétion crée un décalage du cadre de lecture à partir du



c.52 A>del A p.18 R>X

H.Sapiens	1	MGRAVKVLQLFKTLHRTRQQVFKNDARALEAARIKINEEFKNNKSETSSK
P9	1	MGRAVKVLQLFKTLHRT DNKFLKMMPEH*
M.Musculus	1	MGQPAKVLQLFKTLHRTRQQVFKNDKRALEAARVKINEEFKHKHNETSPE
B.Taurus	1	MGQAAKVLQLFKTLHRTRQQVFKNDARALEAARKKINEEFKCNKTETSPK
C.Lupus	1	MGQAAKVLQLFKTLHRTRQQVFKNDTRALEAARIKINEEFKSNKSETSPK
P.Troglodytes	1	MGRAVKVLQLFKTLHRTRQQVFKNDARALEAARIKINEEFKNNKSETSSK
D.Melanogaster	1	-----QVLSAFKKLHRTRQYVFQGDANALAAGRLKINESFLQNRNESS
C.Elegans	1	MRRSRRVLQ--RVTNRLREKNFKTIQRARTMRKRAASAKARNEFSPPAYQSKNNSTE
S.Cerevisiae	1	-----VASLF--LPYTPQFEADVTNSDTAKLVESSMIKVDCCNNQELSNNKQERS

Figure 59 : Arbre familial du patient porteur de mutations *LRYM7*, mutations et conservation phylogénique de la partie modifiée de la protéine.

codon Arg18. Ce nouveau cadre de lecture se termine par un codon stop 11 acides aminés plus loin. Une mutation de ce même gène a été très récemment impliquée dans un déficit sévère du complexe III avec encéphalopathie et acidose lactique {Invernizzi, 2013}.

La deuxième mutation est une mutation ponctuelle dans l'exon 13 (c.2071C>T, p.Arg691Stop) du gène *MTOI* qui code pour une enzyme de modification des ARNt mitochondriaux. Des mutations de ce même gène ont été impliquées dans une maladie mitochondriale associant cardiomyopathie hypertrophique et acidose lactique {Ghezzi, 2012}.

Ces deux mutations ont donc été vérifiées par séquençage direct de l'ADN dans la lignée dérivée du patient mais également dans les prélèvements sanguins des différents membres de la famille, tous en bonne santé apparente. Pour ces deux mutations, les parents sont hétérozygotes, le frère et la sœur sont respectivement homozygote sain et hétérozygote (Figure 59 : exemple pour *LYRM7*). Les deux gènes sont sur des chromosomes différents et leur co-transmission est donc un hasard. Par contre ces deux mutations ont un profil de transmission compatible avec leur responsabilité dans la maladie de l'enfant.

(2) Validation des mutations par complémentation fonctionnelle

En collaboration avec l'équipe du Dr Prokisch, nous avons étudié l'importance relative des mutations de *LYRM7* et de *MTOI* sur les activités mitochondriales. L'équipe du Dr Prokisch s'est chargée de la construction de vecteurs lentiviraux ayant intégré la forme sauvage de l'ADN complémentaire des gènes *LYRM7* ou *MTOI* ainsi qu'un gène de résistance à un antibiotique (blastidicine ou généticine). Ces vecteurs ont été utilisés pour transfecter les cellules du patient P9 et des cellules contrôles (NHDF). Après sélection avec l'antibiotique adéquat, ces cellules nous ont été envoyées pour analyse des activités mitochondriales.

Les activités des différents complexes de la chaîne respiratoire ont été analysées (Figure 60).

- L'activité du complexe III de la lignée P9, significativement inférieure à celle du contrôle, est ramenée à un niveau comparable à celui du contrôle par la transfection avec *LYRM7*. Par contre, la transfection avec *MTOI* ne corrige pas le déficit. Elle semble même avoir un impact négatif sur l'activité des cellules contrôles, une différence à la limite de la significativité étant observée entre cellules contrôles de base et transfectées avec *MTOI*.
- L'activité du complexe IV de P9 est significativement inférieure à celle du contrôle alors que dans nos premières analyses spectrophotométriques la valeur absolue de

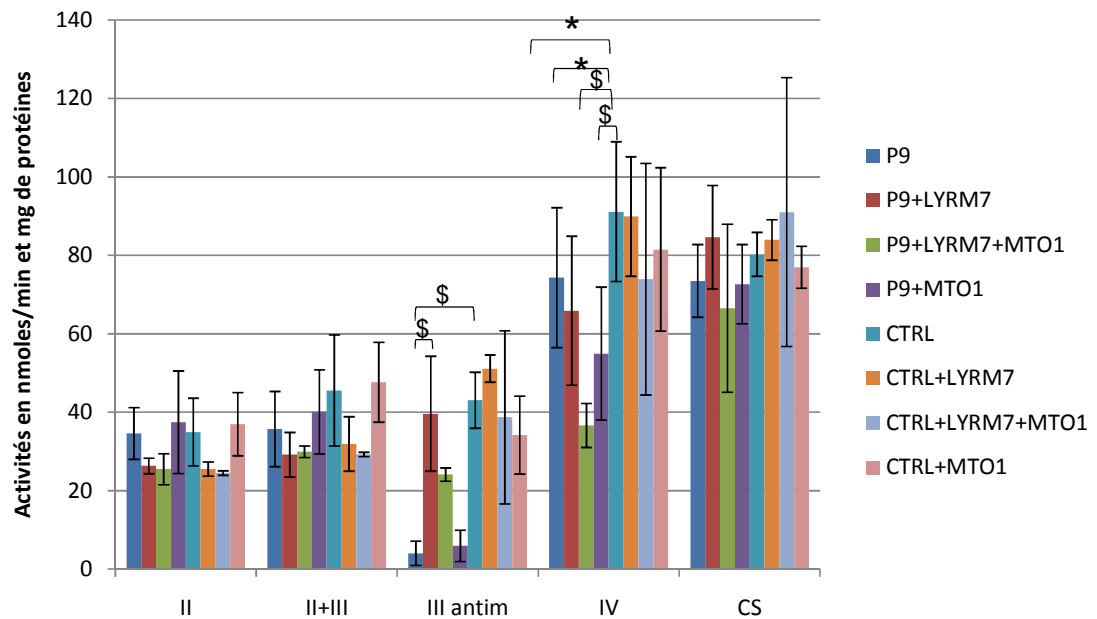


Figure 60 : Modulation des activités mitochondriales par la transfection des cDNA codant pour LYRM7 ou MTO1
P9= cellules du patient P9; ctrl= cellules contrôles (NHDF); *= $p < 0,05$; \$= $p < 0,001$;
II=activité succinate déshydrogénase; II+III= activité succinate cytochrome c oxydoréductase; III antim= activité antimycine sensible ubiquinol cytochrome c oxydoréductase; IV= activité cytochrome c oxydase; CS= activité citrate synthase; valeurs exprimées en moyennes \pm SD.

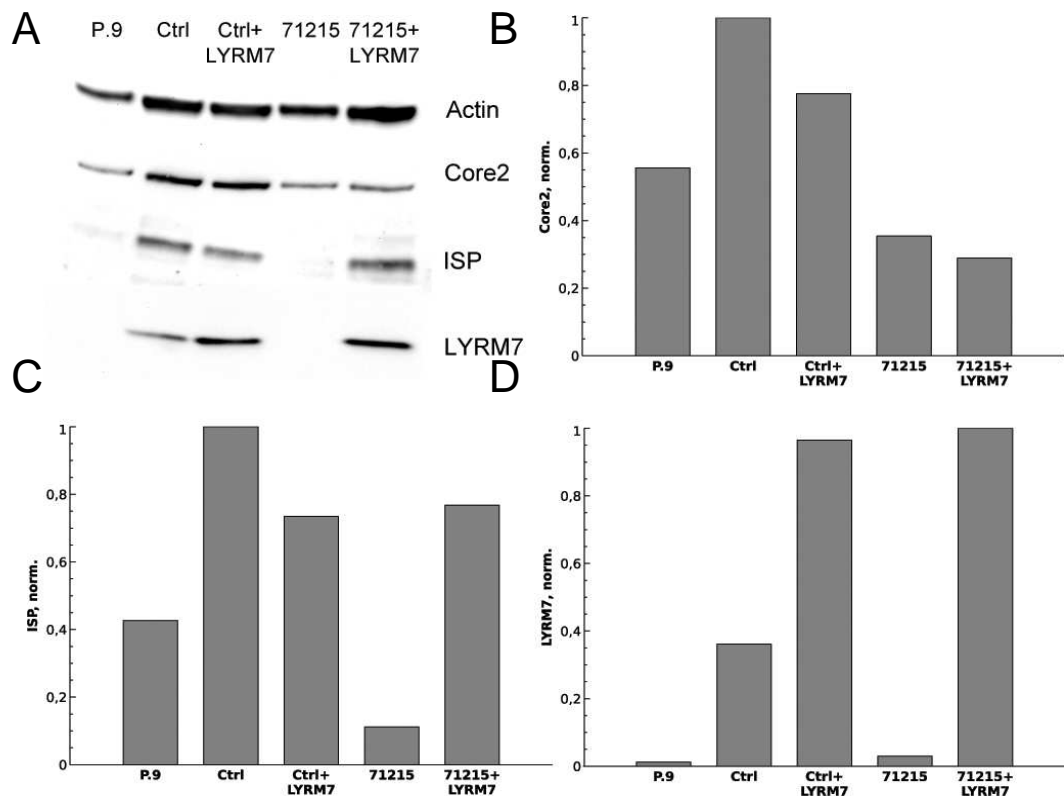


Figure 61 : Expression des protéines core 2, ISP et LYRM7
P.9= cellules du patient P9; 71215 = cellules du patient P9 (laboratoire Dr Prokish); ctrl= cellules contrôles (NHDF)
A : immunomarquage ; B : Quantification Core 2 ; C: Quantification ISP ; D : Quantification LYRM7

l'activité était normale et seule la valeur relative à l'activité citrate synthase était abaissée. Cette différence peut être due à plusieurs éléments : difficultés analytiques, sénescence cellulaire... Aucune des transfections ne restaure l'activité du complexe IV. Au contraire la transfection par *MTO1* semble encore diminuer cette activité.

- Les activités des complexes II, II+III et la citrate synthase ne semblent pas modifiées par la transfection avec les différentes constructions.

Le niveau d'expression des protéines core 2, Rieske et LYRM7 a été analysé par immunomarquage en parallèle dans la lignée P9 et contrôle, avec ou sans transfection (Figure 61). Les cellules P9 non transfectées présentent un niveau de la protéine core 2 légèrement plus faible que les contrôles et un niveau de la protéine Rieske effondré. La transfection par *LYRM7* restaure un niveau d'expression similaire à celui du contrôle pour Rieske confirmant ainsi le rôle de *LYRM7* dans l'anomalie du complexe III.

Les déficits en complexe III sont les moins fréquents des déficits en complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale et sont de ce fait également les moins étudiés. A part les mutations récurrentes du gène mitochondrial *MT-CYB* {Bouzidi, 1996 ; Dumoulin, 1996} et celles de *BCS1L* qui sont responsables de tableaux cliniques très reconnaissables, les altérations des autres gènes (*UQCRB*, *UQCRQ* et *UQRC2* codant des sous-unités du complexe et *TTC19* et *LYRM7* codant des facteurs d'assemblage) ont été décrites dans une ou deux familles ce qui empêche d'avoir une idée précise de leurs conséquences cliniques et biologiques.

C. Discussion

En utilisant les fibroblastes cutanés comme modèle cellulaire nous avons abordé l'étude des déficits en complexe III en posant deux questions différentes. Existe-t-il un profil général biochimique et cellulaire qui serait la signature d'un déficit en complexe III ? Ou bien, au contraire, les déficits en complexe III ont-ils des expressions très différentes en fonction de leur cause génétique ?

La deuxième question imposait évidemment l'identification de la cause des déficits qui n'était connue au début de l'étude que dans 4 cas (*UQCRB*, *BCS1L* deux fois et *MT-CYB*). En associant séquençage de gènes candidats et analyse de l'exome pour 4 patients nous avons identifié la cause génétique certaine dans deux cas : l'une sur le gène d'assemblage *LYRM7* rapporté une fois {Invernizzi, 2013}, l'autre dans le gène de structure *CYC1*, non-encore rapporté en pathologie humaine pour lequel nous avons travaillé en collaboration avec d'autres équipes {Gaignard, 2013}. Nous avons également identifié une cause potentielle dans le gène *MT-CYB* pour un troisième cas.

Le récapitulatif des données obtenues au cours de l'étude du complexe III est effectué dans le tableau 7 des annexes.

1. Les déficits en complexe III en général

a) Discordance des déficits exprimés dans les différents tissus

Pour ce travail, nous avons gardé tous les fibroblastes qui exprimaient un déficit respiratoire et avaient été dérivés d'un patient présentant un déficit en complexe III dans le muscle, le foie ou les lymphocytes.

Si dans 6 cas sur les 15 étudiés, les anomalies des complexes de la chaîne respiratoire des fibroblastes corroboraient les résultats obtenus sur homogénat tissulaire (muscle et/ou foie), ceci n'était pas le cas pour les 9 autres lignées cellulaires ce qui posait le problème d'une différence d'expression tissulaire.

On ne connaît pas d'isoformes tissulaires des sous-unités du complexe III contrairement à la situation observée pour le complexe IV qui possède trois sous-unités avec des isoformes, le plus souvent une isoforme spécifique du muscle et l'autre d'expression ubiquitaire {Capaldi, 1988}.

Parmi les lignées avec déficit discordant par rapport aux analyses tissulaires se trouvaient les deux lignées de fibroblastes porteurs de mutations de *BCS1L* qui présentaient un déficit en complexe IV, isolé dans un cas, associé au déficit en complexe III dans l'autre cas. Cette discordance a déjà été rapportée dans les mutations du gène *BCS1L* où un déficit isolé en complexe III dans le muscle était associé à un déficit en complexe IV dans les fibroblastes {Gil-Borlado, 2009 ; Moran, 2010}. La protéine BCS1L intervient dans la phase tardive d'assemblage du complexe III en permettant l'incorporation de la protéine Rieske. Le complexe III s'associe au complexe I et à deux ou quatre complexes IV au sein de supercomplexes. L'incorporation de la protéine Rieske dans le pré-complexe III a été montrée comme nécessaire à l'assemblage avec le complexe IV {Conte, 2011}. Il est donc possible que le déficit en complexe IV soit secondaire à un mauvais assemblage de ce complexe dans les supercomplexes. Cependant, l'observation d'un déficit en complexe IV isolé, sans aucune anomalie du complexe III, dans l'un des fibroblastes va contre cette hypothèse. De plus une étude récente des mitochondries de foie de souris porteuses de la mutation c.232A>G de *BCS1L* a montré que l'assemblage incomplet du complexe III n'avait pas de conséquence sur l'activité des complexes I et IV {Davoudi, 2014}. Les liens étroits entre les complexes III et IV au sein des supercomplexes restent donc sujet à controverse. Il est également possible que la protéine BCS1L ait des fonctions additionnelles, différant selon les tissus, et qui sont mises en évidence par l'étude des fibroblastes. Il sera nécessaire d'obtenir un plus grand nombre de fibroblastes porteurs de mutations de *BCS1L* pour étudier la reproductibilité du profil enzymatique et en chercher les causes.

L'absence d'identification de la cause des déficits des autres lignées avec déficit enzymatique discordant par rapport aux analyses tissulaires ne permet pas d'avancer des hypothèses sur le mécanisme de cette discordance.

Une hypothèse alternative pour expliquer la discordance des déficits était qu'elle pouvait être due aux difficultés importantes du dosage de l'activité du complexe III. Plusieurs protocoles sont utilisés pour l'analyse de l'activité du complexe III. Elles peuvent générer de grandes différences dans les résultats {Medja, 2009}. Enfin ce dosage, même optimisé, reste difficile : il existe de nombreuses interactions redox et moléculaires entre les différents constituants du milieu de réaction {Chretien, 2004} ; la zone optimale de concentration de substrat et de quantité de protéines est très étroite ; enfin la réduction chimique de la décylubiquinone avant le dosage est également difficile à effectuer de façon reproductible et stable. Dans notre travail, nous avons simplement vérifié que le changement de protocole n'avait pas entraîné de modification systématique des activités.

b) Retentissement sur les flux respiratoires et le potentiel de membrane

La respiration basale était le plus souvent normale. Elle était abaissée dans le cas de déficits du complexe III inférieurs à 20% de l'activité moyenne des fibroblastes contrôles. Le déficit en complexe IV n'avait pas de retentissement ce qui était attendu compte tenu des niveaux élevés de son activité résiduelle. Une seule lignée (P8) sortait de ce schéma impliquant de chercher un autre facteur limitant, par exemple dans les activités des complexes I ou V qui n'étaient pas mesurées par notre protocole d'investigation enzymatique. L'impact sur la respiration maximale suivait le même profil avec une sensibilité un peu supérieure puisque deux des lignées de cellules avec respiration basale normale présentaient une limitation de leur respiration maximale.

Le potentiel de la membrane mitochondriale interne était également le plus souvent normal dans les conditions de base. Là encore, essentiellement pour les cellules ayant les déficits les plus profonds, le protocole utilisé permettait cependant de montrer la labilité de ce potentiel lorsque son maintien nécessitait de recruter les capacités maximales de transfert de protons par la chaîne respiratoire (addition de 1 mM d'ADP ou de faibles doses d'un protonophore). Il est cependant difficile de dire si cette labilité est présente *in vivo*. En effet il est possible que la perméabilisation des cellules par de faibles doses de digitonine induise en elle-même une plus grande fragilité des cellules car elle modifie évidemment l'état à l'équilibre de très nombreux composants du cytosol.

Les capacités respiratoires comme le maintien du potentiel de membrane semblaient donc essentiellement déterminées par l'activité résiduelle des complexes III et IV.

c) Stress oxydant

Le rôle majeur du complexe III dans la production d'ERO au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale nous faisait attendre des perturbations fréquentes de ce métabolisme dans les fibroblastes déficitaires {Lenaz, 2001}. En effet, le flux d'ubiquinol au site Qo apporté par les complexes I et II d'activité normale pourrait ne pas être oxydé efficacement du fait de la réduction d'activité du complexe III. La demi-vie de la semi-ubiquinone au site Qi serait plus longue entraînant l'augmentation de la production des ERO. C'est d'ailleurs ce qui a été observé chez un patient porteur de la mutation m.15579A>G de *MT-CYB* {Lanciano, 2013 ; Wibrand, 2001}.

Pourtant, nous n'avons observé d'augmentation de la production d'ERO en conditions basales que pour quatre lignées qui présentaient des déficits divers : déficit isolé en complexe

III une fois, déficit combiné III et IV une fois et déficit isolé en complexe IV deux fois. Les cellules avec un déficit en complexe IV étaient donc les plus fréquentes ce qui semble indiquer que la réduction de l'efficacité catalytique du complexe IV est un élément très important dans l'induction du stress oxydant.

L'absence de surproduction d'ERO dans la plupart des cellules, notamment celles avec une activité résiduelle très basse du complexe III, pourrait être expliquée par le fait que les déficits génétiques induisent une réduction de la quantité de complexe III (et donc de cycle Q) qui n'est pas obligatoirement associée à un ralentissement du passage des électrons dans le complexe III.

Parmi les lignées montrant une augmentation de production d'ERO se trouvent les deux lignées porteuses de mutations *BCS1L*. Il est possible que l'altération de l'assemblage des supercomplexes I/III/IV due au déficit de BCS1L soit à l'origine de la surproduction d'ERO. Pour aller plus loin dans cette hypothèse il serait nécessaire d'analyser l'assemblage des supercomplexes dans les lignées porteuses de mutations de *BCS1L* ce que nous n'avons pas fait dans ce travail.

L'analyse de l'état à l'équilibre des enzymes anti-oxydantes et des lésions oxydatives des protéines cellulaires demande à être complétée en répétant les analyses sur des temps de passage différents des différentes lignées cellulaires. Cependant il apparaît déjà que l'expression de la SOD2 est nettement modulée et de façon précoce dans de nombreuses cellules alors que ce n'est pas le cas pour la peroxyrédoxine. Ces observations rejoignent tout à fait les données de la littérature { Agier, 2012 ; Miao, 2009 ; Piantadosi, 2012 }.

d) Survie cellulaire au stress

Nous avons tenté de reproduire *in vitro* des conditions de stress pouvant survenir chez les patients afin de déterminer la capacité de résistance des cellules déficitaires en complexe III et/ou IV.

Nous nous attendions à observer une augmentation de l'apoptose notamment du fait de l'impact du niveau à l'équilibre des ERO dans la régulation de nombreux processus cellulaires dont notamment l'activation de protéines kinase et l'apoptose { Droge, 2002 ; Soberanes, 2009 }. Nous n'avons cependant observé une augmentation de l'apoptose que dans deux lignées : l'une en condition basale (P8) et l'autre uniquement sous stimulation pro-apoptotique (P12). Ces deux lignées avaient une production d'ERO apparemment normale.

Par contre, la fragilité des cellules au stress en général a été parfaitement démontrée par les tests de modulation de l'apport en substrats et de stress oxydant exogène. Ces données confirmaient les données montrant la fragilité du potentiel de membrane des cellules déficitaires dans des conditions de stimulation maximale. Parmi les cellules particulièrement sensibles au stress, les fibroblastes de P9, porteurs de mutations de *LYRM7*, et de P13 avaient également un temps de doublement nettement supérieur au contrôle que cela soit sous glucose ou galactose.

e) Présentations cliniques des déficits en complexe III

Les déficits en complexe III étudiés dans ce travail présentaient une grande variabilité de symptômes comme cela est fréquent dans les maladies mitochondriales.

Toutefois, une des caractéristiques communes à tous les patients était la mauvaise tolérance du déficit avec une maladie très sévère pour la plupart des patients. L'âge de début de la maladie était toujours précoce ; tous les patients étaient symptomatiques avant 10 ans, souvent dès les premières semaines ou mois de vie. Plus de la moitié des patients sont décédés prématurément.

La présence d'une atteinte hépatique, parfois extrêmement sévère, est une deuxième caractéristique des déficits du complexe III qui contraste avec la fréquence relativement faible de cette atteinte dans l'ensemble des maladies mitochondriales. Cette atteinte hépatique domine la présentation du patient P1 porteur d'altération du gène *UQCRB*, des patients P2 et P3 portant des mutations du gène *BCS1L*, du patient P9 porteur de mutations de *LYRM7*, et du patient P12 porteur de mutations de *CYCI*. Le patient P4, porteur de la mutation m15498 G>A, p.Gly251Asp {Haut, 2004} de *MT-CYB*, a présenté une atteinte hépatique régressive. Quant au dernier patient avec cause génétique identifiée, P14 porteur de la mutation m.15152 G>A, p.Gly136Ser de *MT-CYB*, il est décédé à 3 jours de vie dans un tableau de défaillance multiviscérale où il est souvent difficile de faire la part des atteintes des différents organes.

Les données de la littérature confirment l'importance de l'atteinte hépatique. Elle est la règle dans les mutations sévères de *BCS1L*, que ce soit dans le syndrome de GRACILE ou dans la forme néonatale d'encéphalopathie avec hépatopathie. Elle existe aussi dans le seul autre cas publié de mutations de *LYRM7* {Invernizzi, 2013}. Elle était également présente dans le cas australien de mutations de *CYCI* publié dans le même article que le patient P12 {Gaignard, 2013}.

2. Les déficits en complexe III en fonction de leur cause génétique

a) Anomalies structurales du complexe III

Une diminution du niveau à l'équilibre de la sous-unité UQCRC2 a été trouvée dans huit des lignées de fibroblastes dont celles avec mutations de UQCRB (P1), celles avec mutations de CYC1 (P12) et celles avec mutation sur MT-CYB (P4). Cette diminution est logique car ces sous-unités interviennent toutes dans la phase précoce d'assemblage du complexe III {Zara, 2009}. Le cytochrome b est la sous-unité d'ancrage ; viennent ensuite se fixer les sous-unités UQCRB et UQCRCQ. Enfin, le cytochrome *c1* s'associe avec UQCRC2 avant son intégration dans le complexe natif.

L'origine génétique n'a pas été identifiée dans les cinq autres lignées avec diminution de UQCRC2. Il serait important de séquencer le gène *UQCRC2* dans lequel une mutation pathogène vient d'être décrite chez un patient présentant l'association d'une hypoglycémie, d'une acidose lactique, d'une cétose et d'une hyperammoniémie {Miyake, 2013}.

La protéine Rieske est, quant à elle, assemblée tardivement dans le complexe III. Sa quantité à l'équilibre a été trouvée diminuée dans 10 lignées de fibroblastes dont 7 présentaient aussi une diminution de UQCRC2. La logique de l'assemblage fait que la réduction de UQCRC2 est supposée entraîner celle de la protéine Rieske. La quantité normale de protéine Rieske malgré la baisse de UQCRC2 dans une des lignées de fibroblastes est donc étonnante. Le faible signal obtenu avec l'anticorps anti-Rieske implique des précautions importantes dans l'interprétation de ce résultat. Dans cet ordre d'idée, il est également étonnant de trouver une quantité normale de protéine Rieske dans les deux lignées porteuses de mutations de *BCS1L* du fait de l'implication de ce gène dans l'assemblage de la protéine Rieske. Cependant, il est notable que l'activité du complexe III est tout à fait normale dans une de ces lignées cellulaires.

A l'inverse, deux lignées (P7 et P9) présentaient une diminution importante de la protéine Rieske contrastant avec une quantité normale de UQCRC2. L'identification de la cause du déficit en complexe III dans la lignée P9 a validé cette observation puisque le gène muté (*LYRM7*) est impliqué dans l'assemblage tardif de la protéine Rieske dans le complexe III.

Les données des électrophorèses en conditions natives ont été superposables aux données obtenues en conditions dénaturantes pour trois lignées présentant une diminution du complexe III assemblé et des sous-unités isolées étudiées en conditions dénaturantes. Il s'agissait des lignées P12, P13 et P9 dont deux ont une cause génétique identifiée (*LYRM7*

pour P9 et *CYCI* pour P12). Dans les autres cas il est possible que les conditions d'électrophorèse en conditions natives n'aient pas été optimales puisque nous avons utilisé des culots cellulaires sans préparation mitochondriale qui sont le matériel choisi pour l'analyse de dépistage diagnostique mais qui donnent des images d'intensité faible.

b) Identifications génétiques

L'analyse du Patient 9 par exome a démontré que les techniques de nouvelle génération pouvaient être à l'origine de difficultés, un grand nombre de mutations étant rapporté que celles-ci soient des polymorphismes connus, des mutations pathogènes connues ou de nouvelles mutations. Il est alors indispensable de démontrer le lien de cause à effet entre les mutations trouvées par le séquençage et le déficit observé. Il est probable qu'en l'absence de possibilité d'une telle démonstration (absence de déficit exprimé dans les cellules en culture par exemple) il faille rester très prudent dans le diagnostic et attendre au moins d'avoir une récurrence suffisante et/ou une ségrégation exacte dans un nombre d'apparentés suffisant avant d'affirmer le lien entre altération génétique et maladie.

Les mutations de *MT-CYB* posent un problème particulier. Dans les deux cas, ces mutations sont homoplasmiques et les apparentés des patients ne présentent pas de signes anormaux malgré la présence de la même mutation, également homoplasmique. Cette situation a déjà été observé avec une mutation de l'ARNt de la valine dont la pathogénicité a pourtant été indiscutablement démontrée {McFarland, 2002}. Le caractère pathogène de ces mutations de *MT-CYB* est cependant uniquement déduit de données statistiques (absence chez les contrôles, conservation phylogénétique de l'acide aminé...). La mutation m15498 G>A, p.Gly251Asp a été décrite dans deux articles mais en association à des tableaux cliniques très différents (cardiomyopathie hypertrophique majeure dans un cas, et Patient P4 dans l'autre). Elle a été transférée chez la levure où elle était associée à une activité apparemment normale du complexe III {Fisher, 2004}. La mutation m.15152 G>A, p.Gly136Ser quant à elle n'a jamais été décrite en association avec une maladie. Elle modifie un acide aminé totalement conservé. Elle n'a été trouvée qu'une fois dans les banques de données, sa fréquence est à 0,01% dans Genbank. Elle a été décrite en association avec l'haplotype U6a mais sa fréquence dans cet haplotype particulier n'est que de 1,1%. Il serait absolument nécessaire pour ces deux mutations d'obtenir des cybrides afin d'en analyser le complexe III.

D. Conclusions-Perspectives

Cette étude a démontré la grande hétérogénéité génétique des déficits en complexe III. Elle nous a conduit à identifier deux causes nucléaires de déficit en complexe III, l'une originale (*CYCI*, en collaboration) et l'autre décrite chez un seul autre patient (*LYRM7*).

Il n'existe pas à proprement parler de profil "type" des déficits en complexe III dans les fibroblastes. Ces déficits sont souvent bien tolérés de base au niveau cellulaire. En particulier, ils ne présentent que rarement une surproduction des ERO. La stimulation par un stress bioénergétique ou oxydant permet le plus souvent de révéler la fragilité cellulaire induite par le déficit. Cette fragilité est à rapprocher de l'évolution clinique des patients souvent marquée par des épisodes de décompensation récurrents.

Ne disposant du diagnostic génétique que pour sept lignées cellulaires, il ne nous a pas été possible de distinguer des « sous profils » en fonction du gène touché. Cependant, les anomalies du gène *BCS1L* semblaient particulières par l'atteinte concomitante, parfois prédominante, du complexe IV et par la fréquence de la surproduction des ERO.

Perspectives : un certain nombre d'analyses n'a pas pu être effectué durant ce travail notamment à cause des délais importants requis pour faire pousser ces cellules déficitaires et de leur tendance à entrer rapidement en sénescence ce qui conduit notamment à une augmentation considérable de la production d'ERO.

Parmi celles-ci nous envisageons de poursuivre la recherche de la cause des déficits par le séquençage des gènes *UQCRC1*, *UQCRC2*, *UQCRH*, *UQCR10* et *UQCR11* codant pour des sous-unités et de *TTC19* codant pour un facteur d'assemblage. L'étude de l'exome n'a donné de candidat clair que dans un cas sur 4. Il nous faudra approfondir les nombreuses pistes indiquées dans les 3 autres cas. Nous désirons étudier de façon approfondie le caractère pathogène des mutations de *MT-CYB* par la réalisation de cybrides suivie de l'étude de leur profil métabolique et cellulaire comme réalisée dans ce travail.

Nous aimerions aussi approfondir notre étude de la composition des OXPHOS en reprenant les analyses en BN-PAGE après solubilisation par le lauryl-maltoside pour vérifier la quantité des différents complexes et résoudre les données discordantes observées avec l'analyse par SDS-PAGE. Nous voudrions également analyser la composition en supercomplexes en solubilisant les mitochondries par de la digitonine. Ces études demandent beaucoup de matériel pour la préparation de suffisamment de mitochondries et nous voulons

donc dans un premier temps nous concentrer sur les cellules présentant des mutations de *BCS1L* qui a été directement impliqué dans l'assemblage des supercomplexes.

(A)

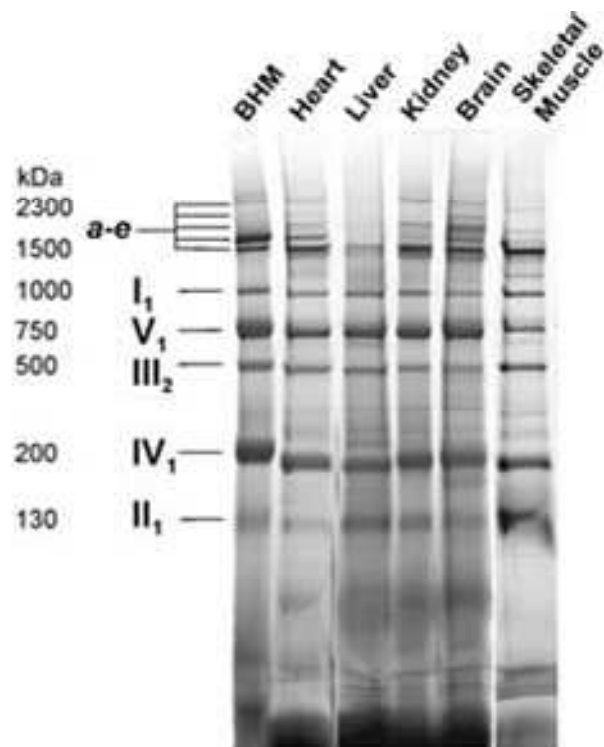


Figure 62 : analyse de la répartition des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale en Blue native PAGE

N.A.Dencher, Annals of the New-York Academy of Sciences, 2007

A-e : supercomplexes ; BHM : bovine heart mitochondria

Les tissus étudiés sont respectivement du cœur, du foie, du rein, du cerveau et du muscle squelettique de rat

IV. Etude de la répartition tissulaire

A. Introduction

L'analyse des déficits humains nous a montré plusieurs cas de déficit généralisé en complexe III qui induisaient des signes cliniques uniquement hépatiques se manifestant par des épisodes récurrents d'insuffisance hépato-cellulaire avec hypoglycémie (P1, P9 et P12). Deux de ces trois cas étaient dûs à l'altération d'un gène de structure du complexe III (*UQCRCB* ou *CYCI*) pour lequel on ne connaît pas d'expression tissu-spécifique. Pour le troisième cas, la mutation probablement à l'origine du déficit s'est avérée être sur un gène codant pour un facteur d'assemblage, *LYRM7*, encore relativement peu connu. Le retentissement purement hépatique du déficit partiel en complexe III de ces patients montre l'importance fonctionnelle majeure du complexe III pour le foie. Nous avons cherché à analyser si cette importance fonctionnelle était corrélée à une répartition tissulaire particulière du complexe III, notamment dans sa quantité par rapport aux autres complexes OXPHOS.

Peu de données quantitatives existent sur ce sujet malgré les nombreuses études de protéomique mitochondriale des différents tissus utilisant soit l'électrophorèse en deux dimensions, native puis dénaturante, soit l'électrophorèse native en une dimension suivie de spectrométrie de masse MALDI-TOF {Dencher, 2007; Chen, 2012 ; Gelfi, 2011}. Dencher et al ont étudié par Blue Native PAGE en une dimension la répartition des complexes dans le cœur, le foie, le rein, le cerveau et le muscle squelettique de rat (Figure 62). Leur but n'était cependant pas la quantification des complexes mais leur étude en spectrométrie de masse MALDI-TOF afin de déterminer le protéome global. L'étude de la figure 62 montre surtout des différences dans la répartition et la quantité des supercomplexes ce qui a évidemment des retombées sur la quantité des complexes isolés. La ligne du muscle est difficile à interpréter du fait d'un défaut de migration. Pour les autres tissus l'étude de la quantité des complexes isolés montre des différences peu marquées : les complexes I et III semblent en quantité similaire dans tous les tissus ; le complexe II apparaît un peu augmenté dans le foie et le rein alors que le complexe IV semble augmenté dans le cœur, le rein et le cerveau, et que le complexe V semble augmenté dans le rein et le cerveau {Dencher, 2007}.

Antonicka et al ont étudié quatre tissus humains différents : muscle squelettique, cœur, foie et fibroblastes par Blue Native PAGE. Les résultats sont exprimés en valeur relative par

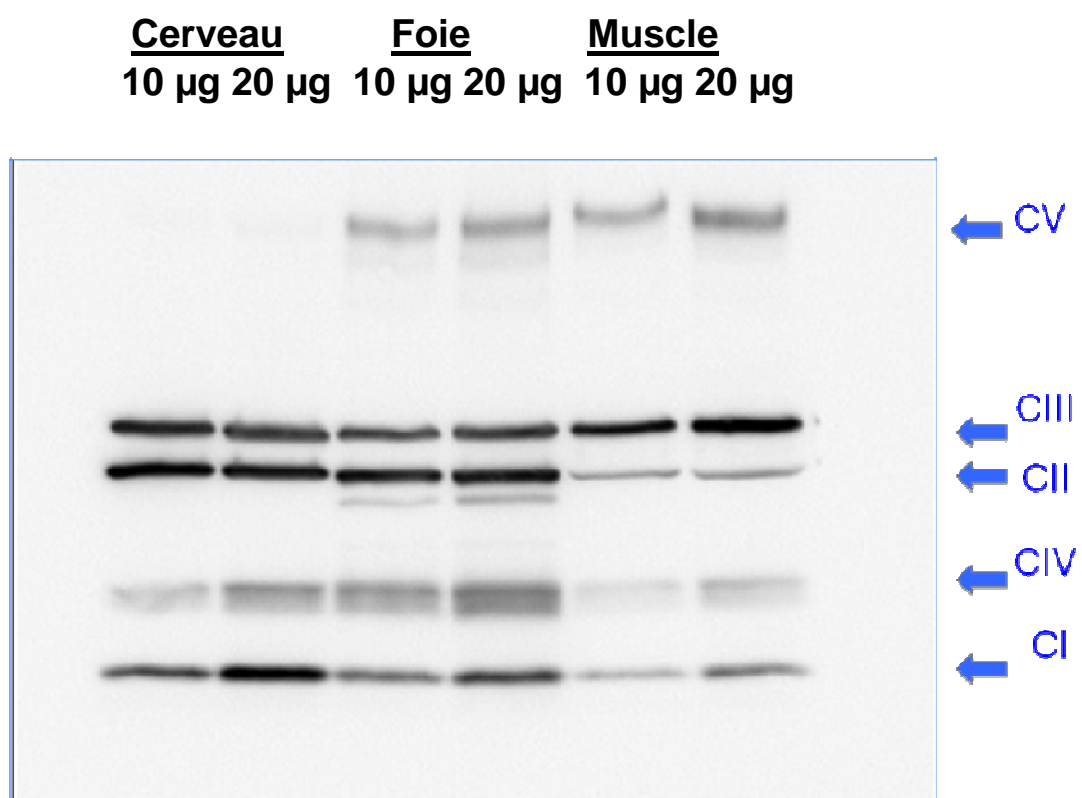


Figure 63 : Exemple de Western Blot après SDS Page (gel 4-20%)
 Anticorps utilisé : Mitoprofile à 1/250° dans lait 2%

rapport au tissu de « référence », le muscle. La distribution cardiaque est similaire à celle du muscle. Par contre, pour le foie, les complexes I, III et IV sont diminués à moins de 20 % des valeurs du tissu de référence et le complexe V à environ 30%. Les résultats sont identiques pour les fibroblastes avec des valeurs encore un peu plus basses. Le complexe II est quant à lui en quantité similaire dans muscle, le cœur, le foie et très diminué (environ 20%) dans les fibroblastes {Antonicka, 2006}.

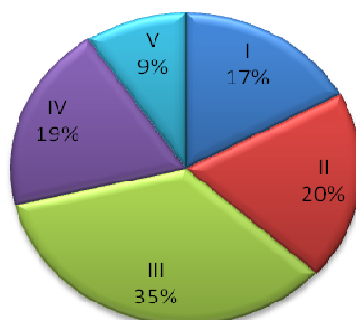
Wittig et son équipe se sont quant à eux intéressés au muscle squelettique humain lors de leur étude comparative du Blue Native PAGE (BNE) et du Clear Native PAGE haute résolution (hrCNE). Les complexes III, IV et V étaient quantifiables par les deux méthodes alors que les complexes I et II étaient seulement détectables par le hrCNE, à priori plus sensible, et donc en quantité moindre {Wittig, 2007}.

Dans notre équipe, nous avons choisi d'effectuer notre étude sur le muscle, le foie et le cerveau de souris. Notre choix de la souris était motivé par le fait que cet animal est utilisé pour générer des modèles animaux de pathologies humaines. Nous avons étudié les trois principaux tissus impliqués dans les maladies associées à un déficit en complexe III. La technique utilisée a été le SDS-PAGE qui a l'avantage de ne pas dépendre de la formation des supercomplexes. Cette technique a en outre l'avantage de nécessiter de faibles quantités de tissu ce qui nous permettait de pouvoir facilement analyser une gamme de concentration de ces derniers. En effet l'efficacité de la reconnaissance de l'antigène dépend très étroitement du Kd de l'anticorps utilisé dans le western blot. Ce Kd varie de façon très importante d'un anticorps à l'autre et il est donc indispensable, lorsque l'on désire quantifier un signal, de vérifier que le signal obtenu est bien dans une zone de linéarité en fonction de la quantité d'antigène sur la membrane.

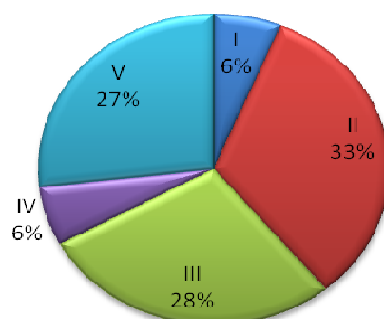
B. Résultats

Pour chaque tissu, différentes gammes de concentrations ont été testées de façon à vérifier que l'analyse utilisait des signaux situés dans une relation linéaire entre signal luminescent et quantité de protéine déposée. Ces gammes ont varié de 5 à 100 µg mais étaient dans la plupart des manipulations entre 10 µg et 50 µg. La linéarité était vérifiée par l'expression des signaux de chaque point de la gamme en pourcentage de la concentration la plus faible et/ou la plus forte utilisée. Nous n'avons gardé pour l'analyse finale que les résultats compris dans une relation linéaire évaluée par des valeurs situées entre 75 et 125% de la valeur de normalisation. Au sein d'un même tissu, les rapports entre les complexes ont

Cerveau



Foie



Muscle

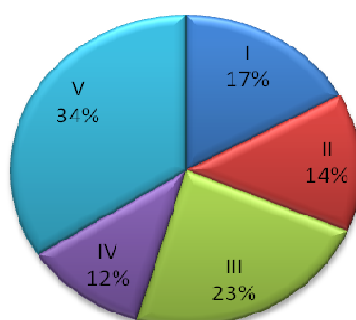


Figure 64 : Répartition des différents complexes en fonction des tissus

permis d'évaluer les proportions relatives de ces différents complexes. Dix Western Blots ont été effectués pour le cerveau, neuf pour le foie, huit pour le muscle. Un exemple de western blot est donné dans la Figure 63.

La quantification des rapports entre les différents complexes dans les trois tissus étudiés est illustrée dans la Figure 64. Le complexe ayant les plus grandes variations entre les différents tissus est donc le complexe V allant de 9% dans le cerveau à 34% dans le muscle. Le complexe ayant les plus faibles écarts est le complexe I variant de 6% dans le foie à 17% dans le cerveau et le muscle. Entre ces deux extrêmes, on retrouve le complexe II (14% dans le muscle à 33% dans le foie), le complexe III (23% dans le muscle à 35 % dans le cerveau) et le complexe IV (6 % dans le foie à 19% dans le cerveau).

La comparaison des trois tissus étudiés montre clairement des différences. Le complexe majoritaire diffère selon le tissu : c'est le complexe III dans le cerveau, le complexe II dans le foie et le complexe V dans le muscle ; le complexe minoritaire diffère également selon les tissus : c'est le complexe V dans le cerveau, les complexes I et IV dans le foie et le complexe IV dans le muscle. On peut noter que le complexe III reste toujours à un haut niveau dans les trois tissus.

C. Discussion

Cette étude montre une différence de répartition des complexes de la chaîne respiratoire entre les différents tissus ce qui est en accord avec les rares données disponibles dans la littérature. Nos données diffèrent cependant de celles obtenues dans l'étude de Dencher {Dencher, 2007}. Toutefois, dans cette dernière, il ne s'agissait d'une part que de données qualitatives et d'autre part les différents supercomplexes observés dans les poids moléculaires élevés n'étaient pas détaillés et pouvaient donc expliquer en partie certaines de ces différences, notamment pour les complexes I, III et IV.

Antonicka et son équipe ont comparé le foie au muscle {Antonicka, 2006}. Nous observons des données tout à fait similaires aux leurs. Enfin, concernant le muscle, nous retrouvons comme dans l'étude de Wittig et al une quantité plus importante de complexe III et V et moindre de I et II {Wittig, 2007}. Par contre, nous trouvons que la quantité relative du complexe IV est aussi basse que celle des complexes I et II.

Le complexe III, principal sujet de notre étude, est le complexe majoritaire dans le cerveau et arrive en deuxième position dans le muscle et le foie. Cette forte expression du complexe III dans les différents tissus est peut être en relation avec son rôle central dans la chaîne respiratoire mitochondriale où il est le point de convergence des électrons de multiples sources (complexe I, complexe II, ETF déshydrogénase).

Le rapport redox CoQH_2/CoQ peut être considéré comme le reflet de la balance entre sources d'électrons convergeant vers la quinone et la réduisant en ubiquinol et concentration du complexe III oxydant l'ubiquinol en quinone. Ce rapport a été mesuré à 6,33, 1,45 et 0,47 dans le foie, le muscle, et le cerveau respectivement {Miles, 2005}. Ces données vont dans le sens d'un complexe III limitant dans le foie puisque l'ubiquinol est plus élevé ce qui coïncide avec les observations cliniques montrant une souffrance majeure du foie en présence de déficit du complexe III. Dans la mesure où le complexe III apparaît fortement exprimé dans tous les tissus, le caractère limitant du complexe III dans le foie est surtout dû à l'augmentation considérable du flux d'électrons sur la quinone, notamment par la surexpression du complexe II.

Ces données nous permettent de nous faire une première idée de la répartition des complexes entre les différents tissus ainsi que de la place du complexe III. Elles restent toutefois à vérifier par d'autres méthodes telles que le Blue Native PAGE et à comparer à des données spectrophotométriques.



Figure 65 : Structure de l'ADN polymérase γ

http://www.uib.no/rg/mitochondrial_medicine/research/polymerase-gamma-polg

Sous-unité catalytique en bleu

Sous-unités accessoires en rose et en vert

V. Etude des conséquences des mutations de l'ADN polymérase γ

A. Introduction

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe I.B.1.b, l'ADN polymérase γ (codée par le gène *POLG*) est l'enzyme clef de la réplication de l'ADN mitochondrial. En 1976, Bolden identifie l'ADN polymérase γ comme étant la seule ADN polymérase présente dans la mitochondrie {Bolden, 1977}. Le rôle de cette enzyme est ensuite mis en évidence en 1987 puis le gène entièrement séquencé et localisé en 1996 et en 1997 respectivement {Lestienne, 1987; Ropp, 1996; Zullo, 1997}.

En 2001, le premier lien entre une mutation du gène *POLG* et une atteinte clinique est établi dans une famille d'ophtalmoplégie externe progressive avec transmission autosomique dominante puis chez des patients atteints d'ophtalmoplégie externe progressive avec une transmission autosomique récessive {Van Goethem, 2001}. Aujourd'hui, les altérations de l'ADN polymérase γ représenteraient la majorité des causes de maladie mitochondriale chez l'adulte soit environ 25% {Lax, 2011}. Elles ont été rapportées comme responsables de tableaux cliniques très différents à la fois dans l'âge de survenue et dans les symptômes associés. Cette diversité symptomatique considérable, souvent présente dans les maladies mitochondriales, complique le diagnostic des maladies à deux niveaux : d'une part, il est difficile de cerner les indications du séquençage du gène *POLG*, d'autre part il peut être difficile d'évaluer le caractère délétère de variants de *POLG* en l'absence de conséquence clinique spécifique des altérations de *POLG*.

1. L'ADN polymérase γ

a) Structure

L'ADN polymérase γ est un hétérotrimère constitué d'un monomère de la sous-unité catalytique, *POLG* codée par le gène *POLG* localisé en 15q25, et d'un dimère de la sous-unité accessoire, *POLGB* codée par le gène *POLG2* localisé en 17q24.1 {Stumpf, 2013} (Figure 65). Les facteurs de régulation de l'expression de *POLG* sont peu connus. NRF-1 (Nuclear respiratory factor-1) est un facteur de transcription régulant l'expression de nombreuses

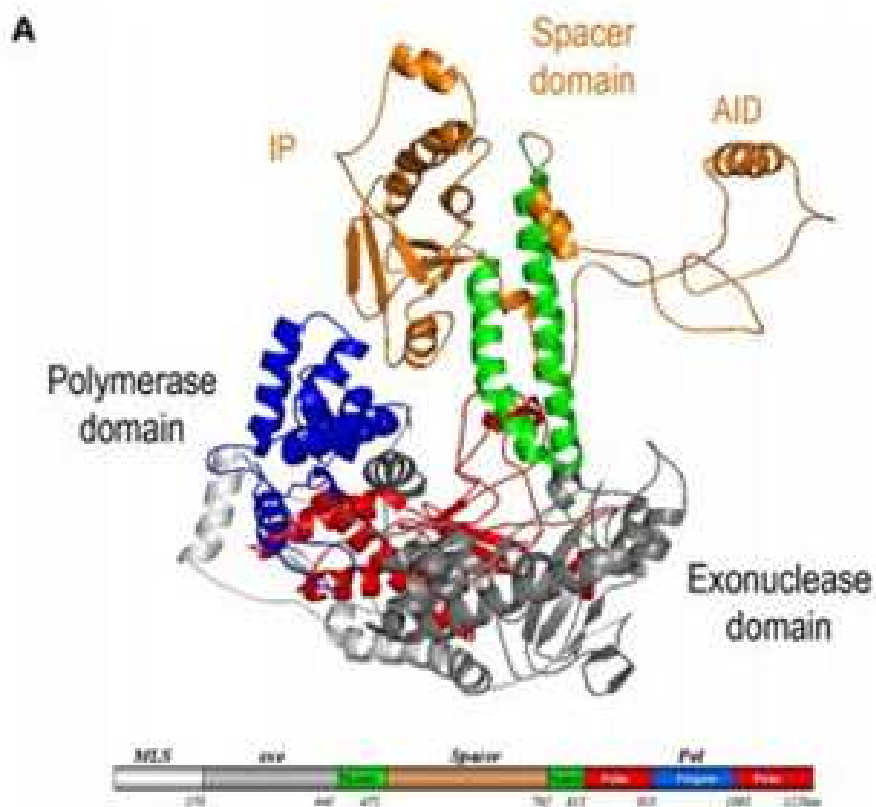


Figure 66 : Structure de la sous-unité catalytique POLG
Y.S.Lee, Cell, 2009

protéines mitochondriales. Son expression est en lien avec le contenu cellulaire en ATP et il se lie au promoteur du gène *POLG*, mais également de *POLGB* ou de *TFAM* {Hudson, 2006}.

La protéine *POLG* comprend 1239 acides aminés et *POLGB* 474 acides aminés. Ces protéines ont une masse respective de 140 et 55 kDa.

La structure cristalline de *POLG* (Figure 66) et de *POLGB* a été établie en 2009 {Lee, 2009}. La sous-unité catalytique de l'ADN polymérase γ possède un domaine polymérase dans sa portion C-terminale, un domaine 3'5' exonucléase dans sa portion N-terminale et enfin un domaine 5'-désoxyribose phosphate (5'dRP) lyase {Zhang, 2011}. La protéine Mip1, orthologue de l'ADN polymérase γ chez la levure, présente 43% d'homologie avec *POLG* ; la majeure partie du domaine polymérase ainsi que des motifs critiques du domaine exonucléase sont notamment conservés {Stumpf, 2011}.

Comme les autres ADN polymérases, l'ADN polymérase γ adopte une conformation tridimensionnelle qui ressemble à une main droite humaine. Six régions hautement conservées, nommée I-VI, ont été identifiées au sein des ADN polymérases. La région I, localisée dans la paume, contient deux acides aspartiques très conservés nécessaires à l'activité catalytique. La région II, au niveau de la paume, et la région III, au niveau des doigts, sont importantes pour la fixation d'un dNTP. La région IV est située au niveau N-terminal et s'étend jusqu'au domaine correspondant au site actif 3'-5' exonucléase. Les deux autres régions, V et VI, sont localisées respectivement au niveau du pouce et des doigts {C.Velours, 2009}.

La sous-unité accessoire *POLGB* est importante pour le maintien de l'efficacité catalytique et l'intégrité structurale de l'enzyme. Elle serait également impliquée dans la reconnaissance de l'amorce ARN dans la région D-loop de l'ADN mitochondrial {Holt, 2003}.

b) Fidélité de la réplication de l'ADN mitochondrial

La sous-unité catalytique de l'ADN polymérase γ possède également une activité exonucléasique. La relation entre l'activité exonucléasique et la fidélité de l'enzyme a été analysée in vitro chez la levure pour la première fois en 1992 par Foury et son équipe ; cette étude a permis de montrer le rôle primordial de l'activité exonucléasique dans la correction des erreurs de réplication in vivo {Foury, 1992}. Comme toutes les polymérases de la famille

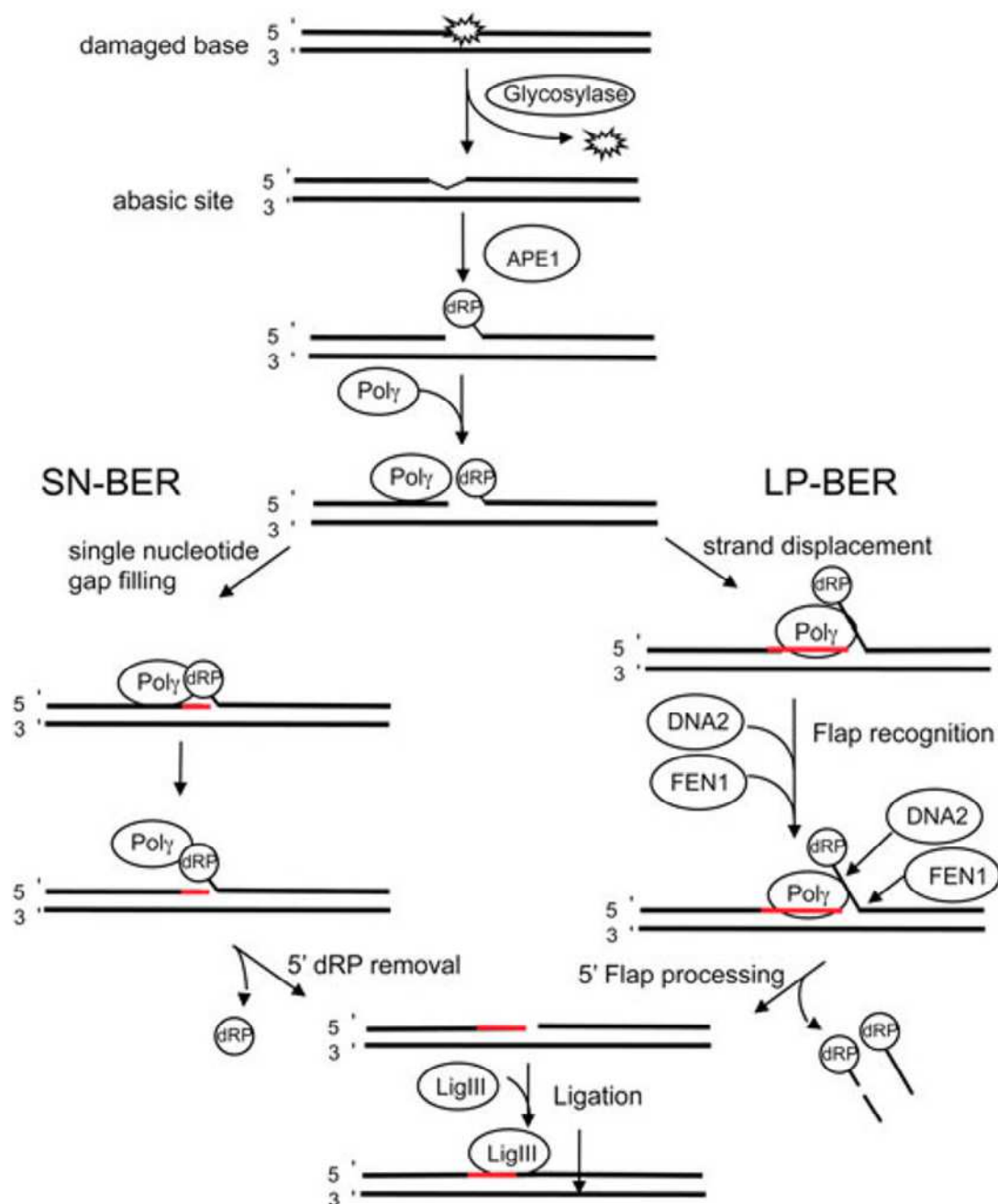


Figure 67 : Processus de réparation des erreurs de réplication de l'ADN mitochondrial

J.D.Stumpf, Cell Mol. Life. Sci., 2011

SN-BER : single-nucleotide base excision repair ; LP-BER : long-patch BER. ; APE : endonuclease ; ligIII : Ligase III. ; FEN-1 : endonuclease ; DNA2 : hélicase DNA2

B (alpha, delta, epsilon et zeta), la fidélité de l'ADN polymérase γ est bonne : inférieure à 2.10^{-6} erreurs par nucléotide {Hudson, 2006}.

POLG est également impliquée dans la réparation de l'ADN mitochondrial. Deux processus de réparation de cet ADN coexistent : le « single-nucleotide base excision repair » (SN-BER) et le « long-patch BER » (LP-BER). Dans les 2 cas, une base est reconnue puis clivée par une glycosylase laissant un site abasique qui est clivé à son extrémité 5' par une endonucléase APE pour générer une brèche portant un 5'dRP. POLG intervient dans les deux processus (Figure 67). Dans le SN-BER POLG vient remplir l'espace laissé précédemment et clive la partie 5'dRP avant l'intervention de la ligase III. Pour le LP-BER, POLG intervient toujours pour la première fonction mais le clivage de la partie 5'dRP est assuré par une endonucléase FEN-1 ainsi qu'une hélicase DNA2 {Stumpf, 2011}.

Une activité reverse transcriptase de POLG a également été mise en évidence in vitro mais sa signification in vivo reste peu claire {Murakami, 2003}.

2. Syndromes cliniques associés à des mutations de *POLG*

a) Signes cliniques généraux

Comme toutes les maladies mitochondriales, celles liées à des mutations de *POLG* sont associées à un large spectre de symptômes impliquant de nombreux organes dont principalement le système nerveux central et périphérique et le muscle.

Ces différents signes peuvent être d'ordre :

- neurologique : atteinte périphérique (neuropathie sensorielle/ganglionopathie, neuropathie sensori-motrice axonale), ataxie cérébelleuse, crises myocloniques, épilepsie, atteinte extrapyramidale (parkinsonisme, chorée),
- musculaire : ptosis, ophtalmoplégie, myopathie proximale et intolérance à l'exercice,
- sensoriel : surdité neurosensorielle, rétinopathie, cataracte,
- psychiatrique : dépression, psychose, démence,
- cérébro-vasculaire : migraine, épisodes stroke-like,
- gastro-intestinal : insuffisance hépatique, troubles de la motricité gastro-intestinale,
- cardiaque : cardiomyopathie,
- endocrinien : diabète, atteinte ovarienne ou testiculaire {Hudson, 2006}.

Malgré la large variabilité phénotypique, il existe des similarités cliniques et d'âge d'apparition de la maladie qui ont permis de différencier cinq syndromes majeurs que nous verrons ultérieurement : syndrome d'Alpers-Huttenlochers, syndrome myocérébrohépatique pédiatrique (MCHS), syndrome MEMSA (épilepsie myoclonique, myopathie et ataxie

sensorielle), neuropathie ataxiante et ophtalmoplégie progressive externe (PEO) avec ou sans neuropathie et dysarthrie (SANDO) {Stumpf, 2013}.

Les maladies liées à des mutations du gène *POLG* évoluent au cours du temps et les différents éléments phénotypiques peuvent avoir des degrés de sévérité ainsi que des âges d'apparition très variables. La vitesse d'aggravation des symptômes ainsi que le délai entre l'apparition du 1^{er} symptôme et celle du 2^{ème} sont très variables.

Le diagnostic est souvent difficile à l'apparition de la maladie. C'est la combinaison des symptômes et leur progression plus que leur sévérité qui aide au diagnostic {Cohen, 2010 ; Stumpf, 2013}.

A ce jour, à notre connaissance, peu de liens génotype/phénotype ont pu être bien établis.

b) Anomalies moléculaires et biochimiques

Plusieurs anomalies ont été décrites comme fréquemment associées à des mutations de *POLG*.

Les mutations dans le domaine polymérase ou la région intermédiaire de *POLG* induisent fréquemment des déplétions et des délétions de l'ADN mitochondrial {Zhang, 2011}. La quantification de l'ADN mitochondrial par Southern Blot ou PCR quantitative peut être effectuée mais elle est à interpréter avec prudence : lorsqu'elle est normale, elle ne permet pas d'exclure une mutation sur *POLG* particulièrement au début de la maladie et il est de plus connu qu'elle varie fortement en fonction des tissus {Cohen, 2010}. La recherche de délétions de l'ADN mitochondrial peut être réalisée par PCR longue. Toutefois, ces anomalies signent une anomalie de maintenance de l'ADN mitochondrial mais ne sont pas spécifiques des mutations sur *POLG*.

De même, le dosage des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale est utile pour le diagnostic de cytopathies mitochondriales mais ne semble pas spécialement spécifique des mutations du gène *POLG* {Stumpf, 2013}.

L'analyse histochimique de la biopsie musculaire peut montrer dès le début de la maladie des accumulations de mitochondries dans la région sous-sarcolemmale puis des Ragged Red Fibers. Ces anomalies sont le plus souvent absentes chez l'enfant comme pour toutes les autres maladies mitochondriales. De plus, des fibres COX- ont déjà été observées dans certains syndromes autosomiques dominants {Zhang, 2011}.

c) Syndromes cliniques

(1) *Syndrome d'Alpers-Huttenlocher*

Ce syndrome a été évoqué pour la première fois par Bernard Alpers en 1931 et caractérisé comme syndrome en 1960 {Alpers, 1960}. Le lien entre neuropathie centrale et atteinte hépatique sera ensuite établi en 1976 par Huttenlocher {Huttenlocher, 1976}. L'âge d'apparition moyen de ce syndrome se situe entre 2 et 4 ans et il est généralement fatal dans les premières années de vie. Il est extrêmement rare puisque sa fréquence estimée est inférieure à 1/1.000.000.

La triade classique comprend : crises épileptiques, régression psychomotrice et hépatopathie. Elle est associée à au moins deux des onze critères suivants : protéinorachie augmentée, spectroscopie montrant une diminution du N-acétylaspartate et une augmentation du lactate, perte de volume cérébral, EEG anormal, atrophie optique ou cécité corticale, potentiels évoqués visuels anormaux avec électrorétinogramme normal, déplétion en ADN mitochondrial dans le muscle ou le foie, déficit de l'activité enzymatique de l'ADN polymérase γ dans le muscle ou le foie, lactate élevé dans le sang ou le liquide céphalorachidien, déficit isolé du complexe IV ou combiné des complexes I,III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale et apparenté atteint de syndrome d'Alpers-Huttenlocher.

Les crises épileptiques sont le premier signe chez environ 50% des patients ; elles sont au départ sensibles aux traitements anti-épileptiques classiques puis deviennent résistantes au décours de la maladie ; le valproate pouvant de plus majorer l'atteinte hépatique {Pronicka, 2011}. L'atteinte hépatique comprend stéatose, prolifération biliaire ductulaire, mort hépatocytaire, désorganisation de l'architecture lobaire, nodules régénératifs et changement oncocytaire. D'autres signes sont fréquemment retrouvés tels que hypotonie, hémiparésie, ataxie et migraines {Cohen, 2010 ; Stumpf, 2011 ; Stumpf, 2013 ; Zhang, 2011}.

Environ 50 mutations sont connues comme responsables de syndrome d'Alpers-Huttenlocher. Elles sont toutes de transmission autosomique récessive {Cohen, 2010 ; Copeland, 2012}.

(2) *Syndrome Myocérébrohépatopathie pédiatrique (MCHS)*

Il s'agit de la forme la plus rare des syndromes associés à des mutations de *POLG*. Ce syndrome peut survenir à partir de quelques mois jusqu'à 3 ans de vie ; il est fatal et d'évolution plus rapide que le syndrome d'Alpers-Huttenlocher auquel il ressemble beaucoup.

Les signes cliniques principaux sont : encéphalopathie, retard du développement, myopathie et insuffisance hépatique. Ils peuvent être associés à des troubles de la motricité gastro-intestinale et de la déglutition, une acidose tubulaire rénale, une pancréatite, des vomissements, des troubles de l'audition et une acidose lactique {Cohen, 2010 ; Stumpf, 2013}.

(3) Syndrome épilepsie myoclonique, myopathie et ataxie sensorielle (MEMSA)

Ce syndrome survient dans l'adolescence tardive. Il comprend épilepsie, myopathie et ataxie. Le premier signe est généralement une polyneuropathie sensorielle évoluant vers l'ataxie. Les crises myocloniques surviennent ensuite. Il convient de noter dans ce syndrome l'absence systématique d'ophtalmoplégie et de RRF (Ragged Red Fiber) ce qui permet de le différencier du syndrome de MERRF {Cohen, 2010 ; Stumpf, 2013}.

(4) Neuropathie ataxiante

La neuropathie ataxiante peut démarrer de l'adolescence précoce à la trentaine, l'âge médian de début étant de 17 ans {Cohen, 2010}. Les patients présentent une neuropathie et une ataxie sans myopathie pouvant être associées à de nombreux autres symptômes : ophtalmoplégie, troubles cognitifs, mouvements involontaires, symptômes psychiatriques, myoclonie, cécité, surdité et troubles hépatiques, dysarthrie et encéphalopathie. A l'IRM sont retrouvées des lésions de la substance blanche {Van Goethem, 2004 ; Hakonen, 2005 ; Stumpf, 2013}.

Le terme neuropathie ataxiante correspond à différents syndromes comme le SANDO (Ataxie neuropathie sensitive/dysarthrie/ophtalmoplégie), le MIRAS (Syndrome d'ataxie mitochondriale récessive) et le SCAE (Syndrome d'ataxie spino-cérébelleuse avec épilepsie). Ces syndromes sont généralement causés par des mutations autosomales récessives. Ils sont fréquemment associés à des délétions multiples de l'ADN mitochondrial musculaire {Copeland, 2012}. Une des principales différences avec le MEMSA est donc la présence fréquente d'une ophtalmoplégie sans signe apparent de myopathie {Cohen, 2010}.

(5) Ophtalmoplégie externe progressive : Syndrome PEO ou PEO+ (en cas d'atteinte multiviscérale)

L'âge de début de cette présentation se situe entre 18 et 40 ans. La caractéristique principale est la présence d'une faiblesse des muscles extra-oculaires résultant en un ptosis et

une ophtalmoplégie. Une myopathie généralisée est présente chez la plupart des patients et possiblement associée à une ataxie, une neuropathie, une dysarthrie ou un syndrome des jambes sans repos {Copeland, 2012 ; Stumpf, 2013}.

La présence de symptômes neurologiques associés définit le groupe des patients PEO+. Il peut s'agir d'une surdité neurosensorielle, d'une dépression, d'un parkinsonisme, d'un hypogonadisme, d'une cataracte et un peu moins souvent d'une cardiomyopathie et d'une dysmotilité intestinale {Cohen, 2010}.

L'étude histologique et moléculaire de la biopsie musculaire révèle le plus souvent des Ragged Red Fibers et des délétions multiples {Copeland, 2012}.

Les PEO de transmission dominante sont dues à une mutation située dans le domaine polymérase d'un seul allèle. Toutefois, la majorité des patients atteints de PEO ont une maladie récessive due à 2 mutations touchant les 2 allèles du gène ; le plus souvent ces patients sont hétérozygotes composites pour des mutations situées sur n'importe quelle partie du gène {Copeland, 2012 ; Gziewicz, 2004}.

(6) *Autres présentations cliniques*

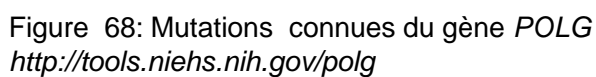
Un syndrome MNGIE-like peut être retrouvé dans certains cas ; il correspond au syndrome de MNGIE décrit dans le paragraphe I-C-2 mais sans leucoencéphalopathie {Van Goethem, 2003}.

Des infertilités masculines, des cancers testiculaires ainsi que des insuffisances ovariennes ont également été rapportées {Copeland, 2012 ; Luoma, 2004 ; Saneto, 2010} mais la responsabilité de *POLG* reste discutée.

3. Mutations de *POLG*

a) Base de données des mutations de *POLG*

La base de données de William Copeland sur le site du NIH (National Institute of environmental Health Sciences) {<http://tools.niehs.nih.gov/polg>} répertorie les mutations publiées du gène *POLG* humain. Actuellement, deux-cent-trente-huit mutations ont été rapportées dans ce gène. Quatre-vingt-sept d'entre elles sont considérées comme pathogènes dans au moins deux articles. Cent-dix mutations n'ont été décrites comme pathogènes que dans un seul article. Enfin, trente-huit sont des polymorphismes et trois ont un statut incertain. Le gène *POLG* est en effet très polymorphe avec des variations de séquence sur toute sa longueur (Figure 68).



b) Caractéristiques générales des mutations de POLG

La plupart des mutations pathogènes de *POLG* sont des mutations faux-sens. En 2008, Wong dénombrait 92.5% de mutations faux-sens et 7.5% de décalage du cadre de lecture ou de non-sens {Wong, 2008}. Les mutations altérant les sites d'épissage sont exceptionnelles {Wong, 2008 ; Rouzier, 2014}.

La transmission de ces mutations est majoritairement autosomique récessive et le plus souvent les patients sont hétérozygotes composés impliquant les deux allèles du gène. Elle peut toutefois être autosomique dominante dans les PEO {Chan, 2009}.

c) Démonstration du caractère délétère des mutations de POLG

Il est souvent difficile de conclure sur le statut d'un nouveau variant ce qui pose des problèmes importants en pathologie humaine.

Le rôle pathogène d'une mutation peut être suspecté si la mutation ségrège avec les symptômes de la maladie dans la famille.

Comme dans beaucoup de maladies, le degré de conservation de l'acide aminé modifié dans *POLG* est un élément très important pour l'évaluation du caractère délétère de la mutation. Dans le syndrome d'Alpers notamment, a été montrée une corrélation importante entre le degré de sévérité de la maladie et le degré de conservation de l'acide aminé. Des mutations situées dans une zone très conservée, le pouce, comme p.Gly848Ser, p.Thr851Ala, p.Arg852Cys et p.Arg853Gln entraînent une diminution drastique de l'activité polymérase (<1% par rapport à la valeur normale) alors que des mutations touchant des acides aminés moins conservés et situés dans une autre zone (paume), comme p.Thr885Ser entraînent une diminution beaucoup plus modérée de l'activité (86% de la valeur normale) ce qui laisse d'ailleurs supposer une absence de pathogénicité de cette dernière {Copeland, 2012 ; Kasiviswanathan, 2009}.

La démonstration du caractère pathogène d'une mutation repose sur des études fonctionnelles : soit la mesure *in vitro* de l'activité enzymatique de la polymérase, soit l'analyse d'organismes modèles comme la levure. Chez la levure sont analysées la formation de colonie « petite » (p-), la fréquence de mutation de l'ADN mitochondrial, l'activité polymérase d'extraits mitochondriaux et la résistance à certains antibiotiques {Baruffini, 2006 ; Stumpf, 2011}. Ces études prennent avantage de la capacité des levures ayant des anomalies de l'ADN mitochondrial (levures rho0 ou rho-) de vivre par la fermentation.

Deux modèles animaux que nous verrons ultérieurement apportent des informations intéressantes {Hudson, 2006 ; Kujoth, 2005 ; Trifunovic, 2004}.

d) Principales mutations de POLG

(1) *Domaine Polymérase*

Cent-cinq mutations sont répertoriées dans ce domaine (figure 68).

Les mutations pathogènes du domaine polymérase induiraient pour la plupart une diminution de la synthèse d'ADN mitochondrial et dans quelques cas des délétions multiples {Cohen, 2010}.

La mutation p.Tyr955Cys est la première mutation ayant été découverte sur *POLG* et plus particulièrement dans le domaine polymérase {Van Goethem, 2001}. Elle a été montrée comme responsable d'une affinité pour les dNTP divisée par 45 et l'enzyme mutée possède une activité inférieure à 1% de la valeur normale {Ponamarev, 2002 ; Chan, 2009}. Une diminution significative de l'activité catalytique est certainement responsable des présentations cliniques sévères pouvant être retrouvées associées à cette mutation dominante {Copeland, 2012}. La mutation p.Tyr757Cys chez la levure, homologue de p.Tyr955Cys chez l'Homme, entraîne d'ailleurs une augmentation du stress oxydant et de la fréquence colonies p- {Stuart, 2006}. Cette mutation est dominante et à l'origine des syndromes adPEO de même que p.Arg943His présentant les mêmes caractéristiques catalytiques. Les mutations p.Gly923Asp et p.Ala957Ser sont également retrouvées dans des syndromes PEO. Cependant, elles conservent environ 30% d'activité enzymatique ; ces données concordent avec la moindre sévérité des signes cliniques observés chez les patients porteurs de l'une ou l'autre de ces deux dernières mutations {Graziewicz, 2004}.

La mutation la plus fréquemment retrouvée dans le domaine polymérase est p.Gly848Ser. Cette mutation récessive est retrouvée majoritairement dans des syndromes d'Alpers et des PEO mais aussi dans des insuffisances hépatiques, syndrome de Leigh, SANDO, myopathies, faiblesses musculaires, encéphalopathies, syndromes MELAS et des épilepsies. L'enzyme *POLG* codée par le gène muté ne conserve quasiment aucune activité polymérasique et voit son affinité de liaison à l'ADN diminuer de 4 à 5 fois. Trois autres mutations situées dans le même domaine, p.Thr851Ala, p.Arg852Cys et p.Arg853Gln sont retrouvées dans les mêmes syndromes et présentent les mêmes caractéristiques {Kasiviswanathan, 2009}.

(2) *Région intermédiaire*

Cinquante-huit mutations sont répertoriées dans ce domaine (figure 68).

Les mutations pathogènes de la région intermédiaire conduiraient à une diminution de l'affinité de la sous-unité enzymatique pour la sous-unité accessoire ce qui induirait des délétions et des déplétions {Cohen, 2010}.

La mutation la plus fréquente dans cette région mais surtout dans la population caucasienne est p.Ala467Thr. Elle est retrouvée chez 1/3 des patients ayant une maladie liée à une mutation de *POLG* et peut être associée à tous les différents syndromes cliniques que nous verrons ultérieurement {Zhang, 2011}. Sa fréquence est 0.6% de la population belge contrôle {Van Goethem, 2001}, 0.69% de la population anglaise {Horvath, 2006}, 1% de la population norvégienne {Winterthun, 2005} et 0.2% dans une population de 380 contrôles finlandais {Luoma, 2005 ; Chan, 2009}. La mutation p.Ala467Thr empêche l'interaction entre les sous-unités de la polymérase γ et réduit l'activité polymérasique à 4% de sa valeur normale {Hudson, 2006}. Cette mutation est rapportée comme pathogène à l'état hétérozygote le plus souvent mais aussi homozygote. A l'état hétérozygote, elle peut être retrouvée dans presque tous les syndromes associés à des mutations de *POLG*. A l'état homozygote, elle a été rapportée dans le cas d'un syndrome MERRF, d'un désordre neurodégénératif, d'un syndrome infantile hépato-cérébral, d'un syndrome MNGIE-like, d'un syndrome SANDO mais aussi dans plusieurs cas de syndrome d'Alpers, d'ataxie, de PEO et d'encéphalopathie {<http://tools.niehs.nih.gov/polg>}.

En terme de fréquence vient ensuite la mutation p.Trp748Ser. Elle est le plus fréquemment retrouvée à l'état hétérozygote et associée à des ataxies ou des syndromes d'Alpers. Elle a toutefois été rapportée comme homozygote dans un cas de SANDO, de MIRAS, de MNGIE-like, de parkinsonisme et dans deux cas d'ataxie cérébelleuse (+/-PEO). Elle est presque toujours retrouvée chez les patients associée en cis avec p.Glu1143Gly (Cf paragraphe (4) ci-dessous). L'enzyme mutée présente un défaut d'activité catalytique, de liaison à l'ADN et de stabilité {Chan, 2009}.

(3) *Domaine exonucléase*

Quarante-et-une mutations sont répertoriées dans ce domaine (figure 68).

Les mutations du domaine exonucléase aboutiraient à une mauvaise fidélité de la réplication de l'ADN mitochondrial {Cohen, 2010}.

La mutation la plus fréquemment retrouvée dans ce domaine est pThr251Ile (toujours en association cis avec p.Pro587Leu). Elle est le plus souvent associée à des PEO ou des syndromes hépato-cérébraux infantiles.

Les études chez la levure ont été couramment utilisées pour mettre en évidence les défauts de fidélité de l'enzyme mutée dans cette zone ; la substitution dans MIP1 des résidus aspartate en 171, 230 ou 347 par une alanine ou une glycine augmente la fréquence de mutations spontanées, cette augmentation étant mise en évidence par l'apparition d'une résistance à l'érythromycine des souches mutées. La fréquence de ces souches est de 0.3+/-0.1, 63+/-18, 77+/-12 et 39+/-13 pour la forme sauvage et les formes substituées en 171, 230 et 347 respectivement {Foury, 1992}.

Deux modèles animaux ont également permis de mettre en évidence le caractère délétère de ces mutations. En 2004, Trifunovic et son équipe créent une souris knock-in homozygote pour la mutation p.Asp257Ala dans le domaine exonucléase de POLG. Cette lignée a présenté des niveaux accrus de mutations ponctuelles de l'ADN mitochondrial ainsi que des déplétions {Trifunovic, 2004}. Dans le second modèle, une substitution de 2 paires de base correspondant aux positions 1054 et 1055 de l'ADNc de POLG a été introduite chez une souris entraînant la substitution p.Asp257Ala dans le domaine exonucléase. Cela a également conduit à l'accumulation de mutations de l'ADNmt au cours de la vie, associée à l'induction de marqueurs apoptotiques, en particulier dans les tissus en division rapide {Hudson, 2006 ; Kujoth, 2005}.

(4) Association de mutations

La coexistence de mutations dans différents domaines chez de nombreux patients complique souvent les choses. Par exemple, de nombreux patients présentent une mutation de la région intermédiaire associée à une mutation du domaine polymérase. Un effet dominant négatif des associations de mutations a été proposé devant l'observation d'une moins bonne survie des patients porteurs de la mutation p.Ala467Thr en association avec une autre mutation par rapport aux patients homozygotes pour cette mutation {Tzoulis, 2006}. L'hypothèse avancée était celle d'une interaction quaternaire entre sous-unités catalytiques de différents hétérotrimères {Hudson, 2006 ; Tzoulis, 2006}. Cette hypothèse a cependant été contredite par l'étude de Neeve en 2012 montrant que les présentations cliniques étaient aussi très diverses chez les patients homozygotes. Cette étude suggérait donc que l'élément déterminant de la sévérité des symptômes n'est pas la localisation ou le type de mutation mais

plutôt d'autres facteurs génétiques ou épigénétiques tels que l'haplotype ou le sexe {Neeve, 2012}.

Enfin, certaines mutations sont proposées pour avoir un rôle modulateur. Ainsi la mutation pathogène p.Trp748Ser est toujours retrouvée en association cis avec le polymorphisme p.Glu1143Gly {Hakonen, 2005}. Cette mutation diminue l'activité catalytique de la polymérase γ et entraîne un défaut de sa liaison à l'ADN ; à l'inverse, l'activité de la polymérase γ porteuse de la mutation p.Glu1143Gly est bonne voire même légèrement supérieure à celle de la polymérase sauvage. La mutation p.Glu1143Gly diminuerait un peu les effets délétères de p.Trp748Ser lorsque ces deux mutations sont associées {Chan, 2006}. Toutefois la protéine p.Trp748Ser_p.Glu1143Gly a une moindre stabilité que la protéine p.Trp748Ser seule. Le polymorphisme p.Glu1143Gly n'aurait donc pas qu'un effet purement bénéfique {Copeland, 2012}.

(5) *Mutations non-sens*

Par ailleurs, il y a plus de dix mutations entraînant la formation d'un codon stop prématuré, un décalage du cadre de lecture ou un transcrit d'épissage alternatif. Les premières décrites étaient associées avec un syndrome d'Alpers (p.Glu873X hétérozygote associée à p.Ala467Thr hétérozygote {Naviaux, 2004}). Contrairement à ce qui était attendu, aucune protéine tronquée n'a pu être détectée par Western blot dans les fibroblastes des patients. Le séquençage de l'ADN complémentaire a montré que seul le transcript provenant de l'allèle porteur de p.Ala467Thr était présent. L'ARN messager issu de l'allèle p.Glu873X avait été dégradé par nonsense mediated decay (NMD). Si on utilise des inhibiteurs du NMD, on observe une augmentation du taux de transcrits contenant la mutation p.Glu873X située dans l'exon 17. Toutefois l'amplification aboutit à des fragments plus courts, l'exon 17 ayant été supprimé par nonsense-associated alternative splicing pathway (NAS) ce qui provoque un décalage du cadre de lecture entraînant l'apparition d'un autre codon stop {Chan, 2005}.

4. *Mutations de POLG2 et syndromes associés*

Bien que le gène *POLG2* ne fasse pas partie de notre étude, les mutations de ce gène sont abordées brièvement dans ce paragraphe car elles peuvent aussi être à l'origine de défaut d'activité de la polymérase γ .

La 1^{ère} mutation a été décrite par Longley en 2006. Il s'agit de p.Gly451Glu retrouvée dans une PEO de transmission autosomique dominante et ptosis avec délétions multiples de l'ADN mitochondrial dans le muscle {Copeland, 2012 ; Longley, 2006}.

La 2^{ème} mutation a été décrite par Ferraris en 2008. La mutation p.Gly416Ala a été considérée comme responsable d'une surdité, d'une ophtalmoplégie, d'une anémie macrocytaire et d'un hypogonadisme. Toutefois, elle était associée à p.Tyr582Cys sur la protéine OPA1. Sa pathogénicité reste donc discutable {Ferraris, 2008}.

La 3^{ème} mutation décrite par Walter en 2010 est une insertion: c.1207-1208ins24. Elle a été décrite chez une femme de 30 ans souffrant de faiblesse musculaire {Walter, 2010}.

En 2011, une étude sur 112 patients d'origine américaine pour lesquels une atteinte mitochondriale en lien avec *POLG* était suspectée a permis d'identifier 7 nouvelles mutations : p.Gly103Ser, p.Leu153Val, p.Pro205Arg, p.Arg369Gly, p.Asp386Glu, p.Ser423Tyr et p.Leu475DfsX2. La caractérisation biochimique de ces variants produits par des souches d'*Escherichia coli* transfectées n'a pas permis de montrer beaucoup de différences avec le phénotype sauvage pour p.Gly103Ser, p.Leu153Val, p.Asp386Glu, et p.Ser423Tyr. A l'inverse, p.Pro205Arg et p.Arg369Gly diminue l'affinité de POLGB pour POLG et p.Leu475DfsX2 empêche POLGB de se lier avec POLG mais aussi avec l'ADN et entraîne une instabilité de la protéine {Young, 2011 ; Copeland, 2012}.

5. **Traitement**

Comme pour toutes les maladies mitochondriales, les traitements employés restent principalement symptomatiques. Par exemple, un ptosis peut être opéré et un pacemaker peut être posé en cas d'insuffisance cardiaque {Zhang, 2011}. Dans la maladie d'Alpers, une aide respiratoire, des conseils diététiques et des traitements anti-épileptiques sont couramment utilisés {Cohen, 2010}.

Sur des modèles de souris transgéniques Y955C souffrant de cardiomyopathie, une augmentation du stress oxydant mise en évidence par l'élévation du taux de 8-oxo-déoxyguanosine de l'ADN mitochondrial a été retrouvée {Lewis, 2007 ; Copeland, 2012}. Des traitements anti-oxydants comme l'alpha-tocotriénol quinone (ATQ3) pourraient donc avoir un effet bénéfique chez les patients porteurs de mutation telle que la Y955C {Shrader, 2011 ; Stumpf, 2013}.

Une étude chez la souris porteuse d'une mutation dans le domaine exonucléasique a également permis de montrer un rôle bénéfique de 5 mois d'exercice d'endurance. Celui-ci induit la biogenèse mitochondriale, prévient les déplétions d'ADNmt, augmente la capacité oxydative mitochondriale et restaure la morphologie mitochondriale dans plusieurs tissus {Safdar, 2011}.

Il a également été suggéré l'emploi d'un traitement général comprenant levocarnitine, coenzymeQ et vitamine B. Toutefois aucune étude concluante n'a confirmé les bénéfices de son utilisation. Il n'existe à l'inverse aucun rapport négatif {Cohen, 2010}.

Enfin, la concentration en nucléotides semble également être cruciale. Les levures porteuses de la mutation humaine p.His932Tyr ont une enzyme ayant un taux de polymérisation diminué de 79% et une affinité de liaison des dNTP 200 fois inférieure par rapport à l'enzyme sauvage. Ces levures retrouvent une réplication quasi-normale si la concentration en nucléotides est augmentée de 100 fois, passant de 2 μ M à 200 μ M. Une surexpression de la ribonucléotide réductase pourrait donc également être une piste envisageable {Stumpf, 2010}.

B. Résultats

1. Recrutement des patients et classification

Le but de notre étude était de faire une analyse de la sensibilité et de la spécificité des signes et symptômes considérés comme indicatifs d'une mutation du gène *POLG*. Pour ce faire, nous avons effectué une étude rétrospective sur 311 dossiers de patients dont le gène *POLG* a été séquencé entre 2005 et 2012 au Centre de Génétique de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Seuls 154 patients avaient des dossiers avec des données suffisantes concernant la clinique et les investigations mitochondriales. 143 de ces patients étaient suivis à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière.

Les données colligées pour ces 154 patients comprenaient les signes cliniques, les résultats d'une analyse électromyographique, et ceux d'une imagerie cérébrale. Nous avons également repris les résultats de l'analyse histopathologique du muscle et ceux des investigations mitochondriales (Figure 69).

Les données cliniques, d'électromyographie et d'imagerie cérébrale ont été analysées par le Dr Maya Tchikviladzé, neurologue à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière, en collaboration avec les Dr Damien Galanaud pour l'imagerie et du Dr Thierry Maisonobe pour l'électromyographie. J'ai colligé toutes les données d'histopathologie musculaire et les analyses mitochondriales, en collaboration avec le Dr Claude Jardel.

Les patients ont été classés en trois groupes selon les résultats de leur séquençage du gène *POLG* : 34 patients présentaient des mutations délétères sur les deux allèles (groupe *POLG*^{+/+}), 10 patients avaient une mutation délétère sur un seul allèle (*POLG*^{+/-}) et 110

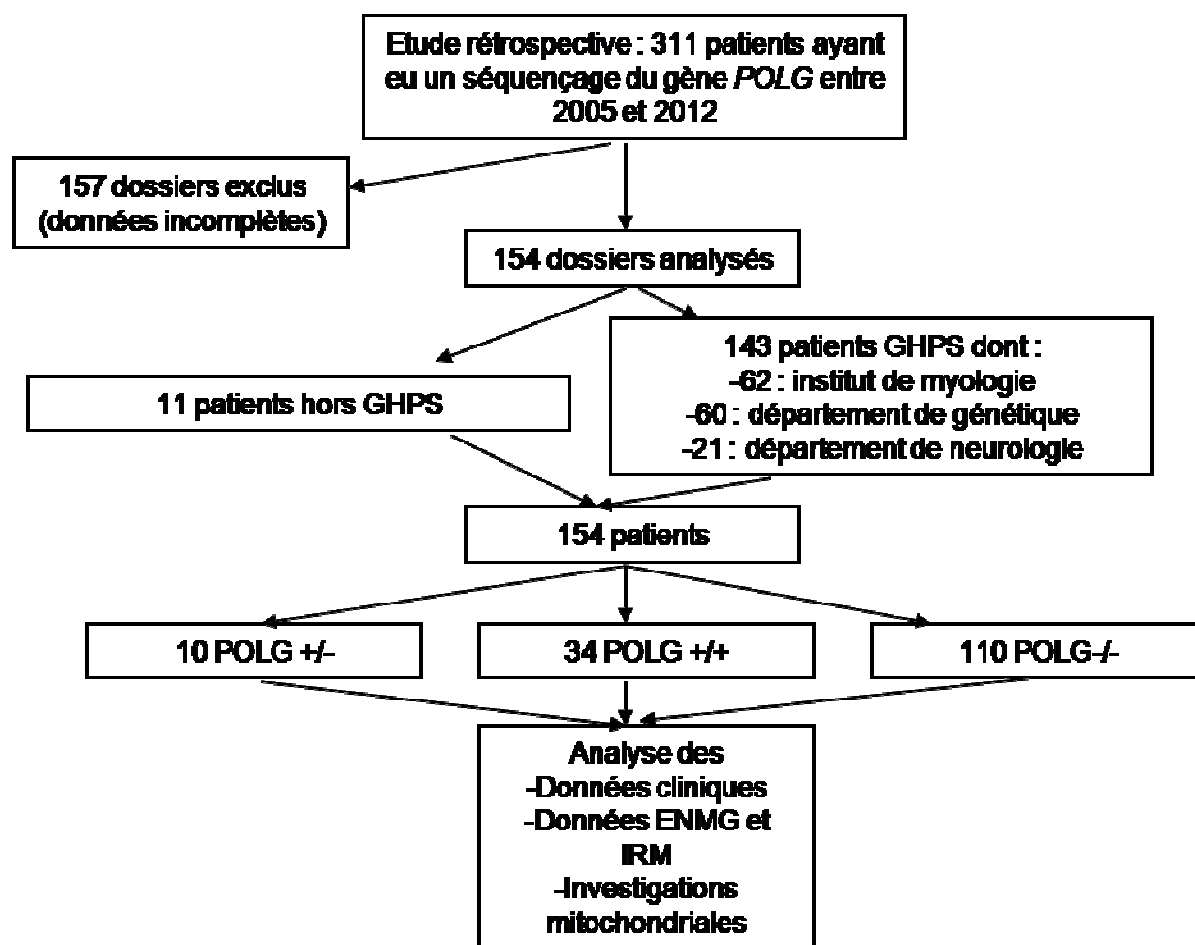


Figure 69 : Constitution de la cohorte de l'étude *POLG*

ENMG : électroneuromyogramme ; IRM : imagerie par résonnance magnétique ; GHPS : Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière

	<i>POLG</i> ^{-/-}	<i>POLG</i> ^{+/+}	<i>POLG</i> ^{+/-}
Nombre de patients	110	34	10
Sexe (M/F)	58/52	23/11	6/4
Age de début de la maladie	29±21 (0-1 68)	31±17 (2-61)	21±20 (1-51)
Durée de la maladie	20±16 (0,5-71)	19±11 (4-51)	26±13 (7-42)

Tableau 13 : Description de la cohorte de l'étude *POLG*

patients aucune mutation délétère ($POLG^{-/-}$). Le ratio homme/femme de cette population est de 1.3 et l'âge moyen au diagnostic d'environ 30 ans. Ces deux paramètres sont détaillés en fonction des 3 classes citées précédemment dans le tableau 13.

2. Mutations de *POLG*

Trente-trois mutations ont été identifiées dans cette étude. Ces mutations et leurs caractéristiques sont listées dans le Tableau 1 des données supplémentaires de l'article mis en annexe et dans la Figure 70. Elles sont résumées dans le Tableau 14. Dix-neuf de ces mutations sont nouvelles ou non classées.

Quelques mutations étaient récurrentes dans la population analysée : p.Trp748Ser (n=15) soit 10% de la population mutée, p.Ala467Thr avec une fréquence de 9% (n=14), p.Pro587Leu en association avec p.Thr251Ile avec une fréquence de 5% (n=8) et p.Gly848Ser avec une fréquence de 4% (n=6). Par contre toutes les autres mutations n'ont été détectées qu'une ou deux fois.

(1) *Evaluation du caractère pathogène des mutations*

Le caractère pathogène des différentes mutations a été évalué en fonction de :

- leur association en *trans* avec une mutation connue délétère,
- du changement d'acide aminé si la position de ce changement était identique à une position de mutation pathogène déjà connue,
- et enfin d'un score de pathogénicité obtenu avec quatre logiciels de prédiction qui tiennent compte de la conservation phylogénétique de l'acide aminé modifié, du changement conformationnel de la protéine, et de données différentes selon le logiciel (antécédents rapportés dans la littérature...). Ces derniers éléments expliquent une certaine variation de la réponse donnée selon le logiciel. Nous avons utilisé les logiciels Polyphen, SIFT, GVGD et Mutation Taster qui sont les plus couramment utilisés en pratique de diagnostic génétique. Un score global allant de 0 (pas de pathogénicité pour les 4 logiciels) à 4 (mutation pathogène pour tous les logiciels) a été établi. Par exemple, la mutation p.Leu397Val est donnée comme pathogène par Polyphen et MT mais pas par SIFT et GVGD. Le score est donc de $1+0+0+1=2$.

Cette analyse a permis de classer assez facilement toutes les mutations sauf la mutation p.Gly517Val que nous avons observée à l'état homozygote. Cette mutation est maintenant considérée comme un polymorphisme par tous les logiciels de prédiction. Elle a déjà été rapportée comme pathogène à l'état dominant ou récessif (en *trans* avec

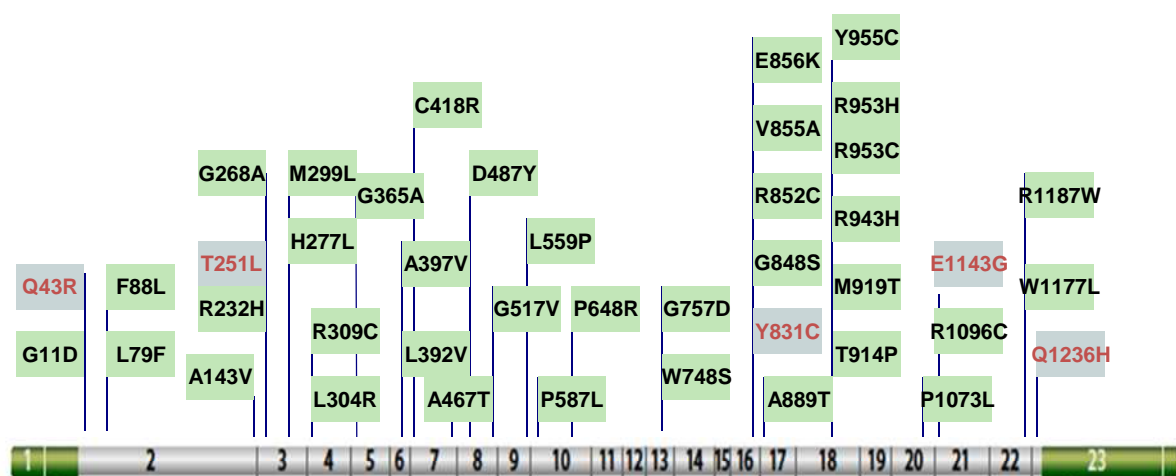


Figure 70 : Position des mutations sur le gène *POLG*
 Les mutations retrouvées dans l'étude sont listées au dessus du gène.
 Les mutations dans les carrés verts sont reconnues comme pathogènes et les mutations dans les carrés bleus sont des polymorphismes (T251L et E1143G étant toujours trouvés en association en *cis* avec des mutations pathogènes)

p.Arg722His} {Blok, 2009 ; Bolszak, 2009 ; Hopkins, 2010 ; Horvath, 2006 ; Sarzi, 2007}. Elle n'entraîne qu'une diminution de l'activité de 20 % sans diminution de l'efficacité catalytique totale {Kasiviswanathan, 2011}. La possibilité que d'autres activités de POLG non analysées dans les tests habituels, comme l'activité DRP-lyase, soient importantes pour la réplication de l'ADN mitochondrial a été récemment discutée à propos de cette mutation {Stumpf, 2013}. Nous avons considéré la mutation p.Gly517Val à l'état homozygote comme responsable de la maladie.

(2) Mutations ne touchant qu'un allèle du gène *POLG*

Les mutations n'affectant qu'un seul allèle du gène *POLG* posaient plus de problème d'évaluation puisque l'on perdait l'association à une mutation éventuellement déjà connue comme pathogène.

De plus, le caractère le plus souvent récessif de la transmission des maladies faisait douter de la pathogénicité d'une seule mutation. L'absence d'échantillons disponibles de membres de la famille a empêché d'étudier si la présence de la mutation ségrégeait avec les symptômes.

Deux des 10 mutations rencontrées étaient déjà connues comme pathogènes et dominantes : p.Arg943Cys et p.Tyr955Cys {Copeland, 2012}.

La recherche de réarrangement intragénique a été effectuée par QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragment) chez les patients porteurs des mutations p.Pro1073Lys {Rouzier, 2014 ; patient 14} et p.Phe88Leu. Aucun saut d'exon n'a été détecté.

Parmi les huit mutations non classées, nous avons considéré deux nouvelles mutations comme pathogènes (p.Gly365Ala et p.Val1177Leu). Nous n'avons pas pu conclure pour les 6 autres patients qui présentaient soit un variant de pathogénicité impossible à établir (p.Phe88Leu, p.Gly268Ala et p.Leu392Val) soit une mutation habituellement récessive (p.Gly848Ser chez deux patients et p.Pro1073Lys).

3. Investigations mitochondriales

Les investigations mitochondriales prises en compte dans notre étude comprennent le dosage du lactate dans le sang ou le liquide céphalorachidien, l'histopathologie musculaire, la mesure des activités de la chaîne respiratoire et la recherche de délétions de l'ADN mitochondrial musculaire par PCR longue (Tableau 15 et Figure 71).

Fréquence au sein de notre population (allèles)	Score de pathogénicité	Mutations
15	2	p.Trp748Ser
14	2	p.Ala467Thr
8	1	p.Thr251Ile (pol associé)
8	2	p.Pro587Leu
6	4	p.Gly848Ser
2	4	p.Leu304Arg
	4	p.Arg309Cys
	3	p.Leu559Pro
	3	p.Glu856Lys
2	2	p.Phe88Leu
	2	p.Pro648Arg
	0	p.Gly517Val
1	4	p.Gly757Asp
	4	p.Arg852Cys
	4	p.Val855Ala
	4	p.Ala889Thr
	4	p.Met919Thr
	4	p.Arg943His
	4	p.Arg953Cys
	4	p.Arg953His
	4	p.Tyr955Cys
	4	p.Pro1073Lys
	3	p.Leu79Phe
	3	p.Ala143Val
	3	p.Gly268Ala
	3	p.Leu392Val
	3	p.Cys418Arg
	3	p.Asp487Tyr
	3	p.Arg1096Cys
	2	p.Gly365Ala
	2	p.Leu397Val
	2	p.Val1177Leu
	1	p.Met299Leu

Tableau 14 : Mutations mises en évidence dans l'étude
Le score de pathogénicité est calculé à partir des données de 4 logiciels de prédiction (Polyphen, SIFT, GVG D et Mutation Taster)

a) Fréquences d'investigation

Le lactate a été dosé pour 44% des patients (n=69) avec une répartition de 47% des patients du groupe POLG^{-/-} (n=52), 35% du groupe POLG^{+/+} (n=12) et 50% du groupe POLG^{+/-} (n=5).

L'histopathologie musculaire était disponible pour 75% des patients (n=115) [71% du groupe POLG^{-/-} (n=78), 82% du groupe POLG^{+/+} (n=28) et 90% du groupe POLG^{+/-} (n=9)].

Les activités des complexes de la chaîne respiratoire ont été mesurées chez 50% des patients (n=77) [45% dans le groupe POLG^{-/-} (n=50), 62% dans le groupe POLG^{+/+} (n=21) et 60% du groupe POLG^{+/-} (n=6)].

La présence de délétions de l'ADN mitochondrial a été recherchée par PCR longue pour 61% des patients (n=94) [62% dans le groupe POLG^{-/-} (n=68), 59% dans le groupe POLG^{+/+} (n=20) et 60% dans le groupe POLG^{+/-} (n=6)].

Pour ces quatre paramètres, la proportion de patients analysés n'est pas significativement différente entre les groupes POLG^{-/-} et POLG^{+/+} (p=0,27 ; p=0,30 ; p=0,14 et p=0,98 avec un test de Chi² pour les 4 tests respectivement).

b) Comparaison entre les groupes POLG^{+/+} et POLG^{-/-}

(1) Concentration de lactate sanguin

22 patients sur 52 analysés dans le groupe POLG^{-/-} (42%) et 7 patients sur 12 dans le groupe POLG^{+/+} (58%) ont un taux élevé de lactate dans le sang (supérieur à 1.8 mmol/litre à l'état de jeûne). Il n'existe donc pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes (p=0,49 avec un test de Chi²).

La sensibilité et la spécificité de la présence d'un lactate sanguin élevé sont de 58%. Pour rappel, la sensibilité d'un test mesure sa capacité à donner un résultat positif lorsqu'une hypothèse est vérifiée. Elle s'oppose à la spécificité, qui mesure la capacité d'un test à donner un résultat négatif lorsque l'hypothèse n'est pas vérifiée.

(2) Histopathologie musculaire

53 patients sur 78 analysés dans le groupe POLG^{-/-} (68%) et 27 patients sur 28 dans le groupe POLG^{+/+} (96%) présentent des anomalies histologiques musculaires, ces anomalies pouvant être des accumulations mitochondriales et/ou la présence de fibres dépourvues d'activité cytochrome coxydase (Figure 72). Les accumulations mitochondriales étaient le

	POLG ^{-/-} (n=110)	POLG ^{+/+} (n=34)	POLG ^{+/-} (n=10)	Sensibilité / Spécificité
Taux de lactate	52 (47%)	12 (35%)	5 (50%)	58%/58%
- Elevé (>1.8 mmol/l)	22	7	4	
- Normal(<1.8 mmol/l)	30	5	1	
Histologie musculaire	78 (71%)	28 (82%)	9 (90%)	96%/32%
-SDH++	37	27	6	
-COX-	43	25	6	
-SDH++ et COX-	32	25	5	
-Normale	25	1	2	
Activités enzymatiques	50 (45%)	21 (62%)	6 (60%)	33%/64%
-Déficits isolés	10	5	1	
-Déficits combinés	8	2	2	
-Normal	32	14	3	
PCR longue	68 (62%)	20 (59%)	6 (60%)	85%/40%
-Profil anormal	41	17	4	
-Profil normal	27	3	2	

Tableau 15 : Résultats des investigations mitochondriales

SDH++ : accumulation mitochondriale visualisée par l'activité succinate deshydrogénase

COX- : fibres déficitaires en activité cytochrome c oxydase

Profil anormal en PCR longue : présence de bandes multiples additionnelles à la bande de la taille attendue

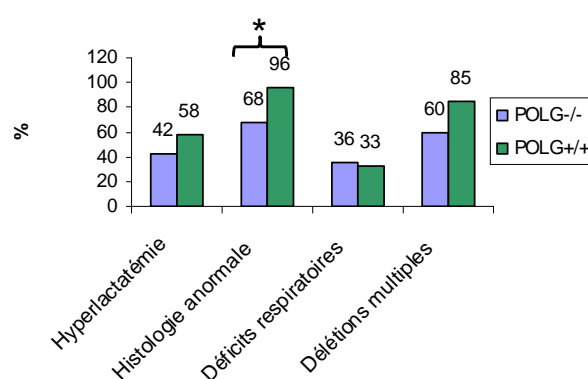


Figure 71 : Prévalence des anomalies mitochondriales

*p <0,05 (test de Chi2)

Hyperlactatémie : lactate supérieur à 1.8 mmol/L ; histologie musculaire anormale = présence de fibres COX-, de fibres rouges déchetées et/ou de fibres SDH+ ; déficits respiratoires = déficit isolé ou combiné des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ; délétions multiples = délétions de l'ADN mitochondrial détectées par PCR long range.

Les fréquences observées pour les 2 classes (POLG^{-/-} et ^{+/+}) sont indiquées au dessus de chaque barre de l'histogramme.

plus souvent modérées comme illustré dans le Figure 73, réalisant un aspect diffus un peu plus foncé de l'activité succinate déshydrogénase ou une accentuation sous-sarcolemmale de cette activité dite « en coups d'ongles ».

Les patients du groupe POLG^{+/+} ont significativement plus d'anomalies histologiques que les patients du groupe POLG^{-/-} (p=0,006 avec un test de Chi²).

Plus de 60% des patients présentant des anomalies histologiques cumulent la présence d'accumulations mitochondriales et celle de fibres dépourvues d'activité cytochrome c oxydase.

La sensibilité de la présence d'altérations histologiques musculaires est de 96% mais sa spécificité seulement de 32%.

(3) Analyse de la chaîne respiratoire mitochondriale

18 patients sur 50 analysés dans le groupe POLG^{-/-} (36%) et 7 patients sur 21 dans le groupe POLG^{+/+} (33%) sont porteurs d'un déficit d'un ou plusieurs complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes (p=0,95 avec un test de Chi²). Dans le groupe POLG^{+/+}, les déficits isolés sont au nombre de cinq alors que les combinés sont au nombre de deux ; le faible nombre de patients analysés dans ce groupe ne permet pas de tirer de conclusion pertinente.

Avec la réserve due au faible nombre de patients analysés, la sensibilité de la présence de déficits des activités respiratoires apparaît médiocre (33%) mais sa spécificité semble meilleure (64%).

(4) Recherche de délétions de l'ADN mitochondrial

41 patients sur 68 analysés dans le groupe POLG^{-/-} (60%) et 17 patients sur 20 dans le groupe POLG^{+/+} (85%) présentent des délétions multiples de l'ADN mitochondrial musculaire analysé par PCR longue (Figure 73). La proportion de patients porteurs de délétions dans le groupe POLG^{+/+} est supérieure à celle du groupe POLG^{-/-} mais la différence entre les deux groupes reste statistiquement non-significative (p=0,075, test de Chi²).

La sensibilité de ce paramètre est de 85% mais sa spécificité seulement de 40%.

(5) Associations d'investigations mitochondriales

Nous nous sommes ensuite intéressés aux associations de paramètres deux à deux (Figure 74). La seule association différant statistiquement entre le groupe POLG^{+/+} et le

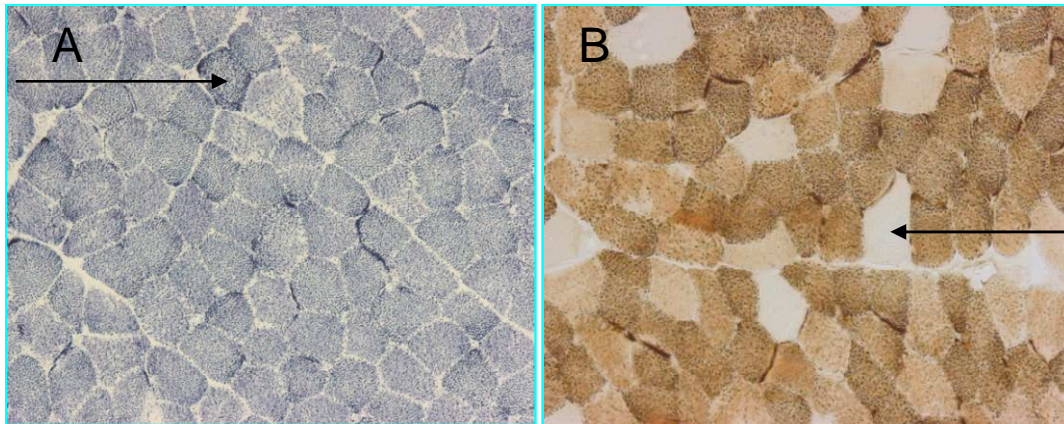


Figure 72 : Anomalies histopathologiques musculaires rencontrées chez les patients POLG $+/+$ ou $+/-$

A : succinate déshydrogénase → accumulation mitochondriale

B : cytochrome c oxydase → déficit en cytochrome c oxydase

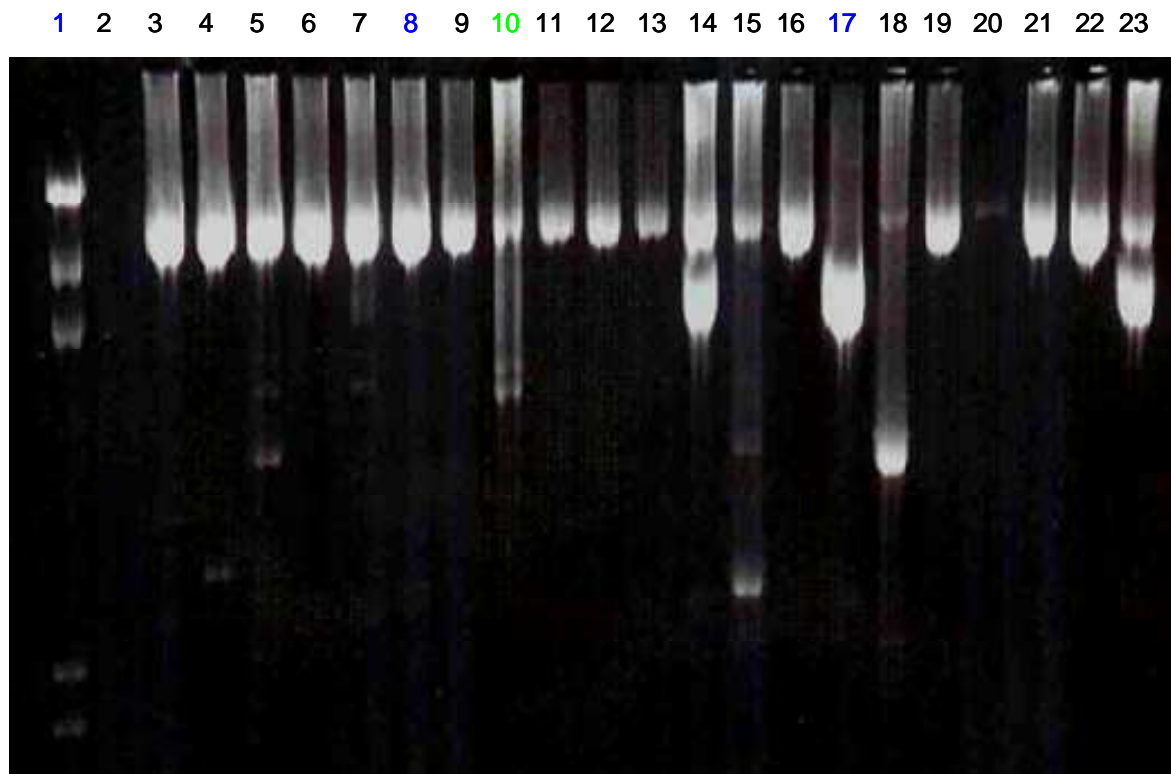


Figure 73 : Exemple de résultat de PCR longue

1 : Marqueurs de Poids Moléculaire, 8 : échantillon contrôle → amplification normale, 10 : échantillon POLG $+/+$ → délétions multiples, 17 : échantillon « positif » → délétion de grande taille de l'ADN mitochondrial

Les autres échantillons sont des ADN de patients à analyser: 2, 20 : pas d'amplification, 3-7, 9, 11-13, 16, 19, 21, 22 : pas de délétion visible, 14 et 23 : délétion de grande taille de l'ADN mitochondrial, 15, 18 : délétions multiples.

groupe POLG^{-/-} est celle comprenant la présence de délétions de l'ADN mitochondrial et une histologie musculaire anormale avec un pourcentage de 89% pour les POLG^{+/+} et de 43% pour les POLG^{-/-} (p<0,01 avec un test exact de Fischer du fait du petit nombre d'observations). Toutefois la spécificité de cette association est à 57% et reste donc insuffisante pour le diagnostic.

La sensibilité (70%) et la spécificité (67%) sont intéressantes pour l'association comprenant une histologie anormale et une concentration de lactate élevée mais le faible nombre de patients POLG^{+/+} ayant eu les deux paramètres testés est trop faible pour obtenir une différence significative entre les deux groupes (p = 0,067 avec un test de Fischer).

On ne disposait de l'ensemble des quatre paramètres d'investigation mitochondriale que pour 19% de la population totale sans différence entre les groupes (POLG^{+/+} n=6 (17%) et POLG^{-/-} n= 21(19%), p=0,78 avec un test de Chi2). Ce faible nombre de patients ne permet aucune conclusion pertinente mais on peut remarquer que seul un patient sur 21 du groupe POLG^{-/-} présentent les quatre paramètres anormaux.

c) Population POLG^{+/-}

La population POLG^{+/-} n'a pas été incluse dans la comparaison avec la population POLG^{-/-} pour deux raisons principales. D'une part, le faible nombre de patients dans cette classe (n = 10) ne permettait pas de faire des comparaisons statistiques ; d'autre part, sur les dix mutations répertoriées, huit étaient des nouvelles mutations dont la responsabilité dans la maladie restait discutable même si nous avons considéré que deux de ces mutations étaient très probablement pathogènes (voir paragraphe sur les mutations).

Il est toutefois intéressant de noter que les deux patients porteurs de mutations reconnues comme pathogènes dominantes présentaient soit trois paramètres mitochondriaux anormaux (histopathologie, activités enzymatiques et taux de lactate) pour le patient porteur de la mutation p.Arg943Cys soit quatre paramètres anormaux pour le patient porteur de la mutation p.Tyr955Cys.

4. Phénotype des patients

Ces données ont principalement été analysées par le Dr Maya Tchikviladzé, neurologue au centre hospitalier de la Pitié-Salpêtrière et sont détaillées dans l'article présenté en annexe. Seuls les groupes POLG^{+/+} et POLG^{-/-} ont été comparés.

A	Histologie musculaire	Activités respiratoires	PCR longue
Dosage du lactate	40/10	27/9	35/8
Histologie musculaire		48/21	67/19
Activités respiratoires			42/14

B	Histologie anormale	Déficits respiratoires	Délétions multiples
Hyperlactatémie	13/7	8/2	9/4
Histologie anormale		15/6	29/17
Déficits respiratoires			10/4

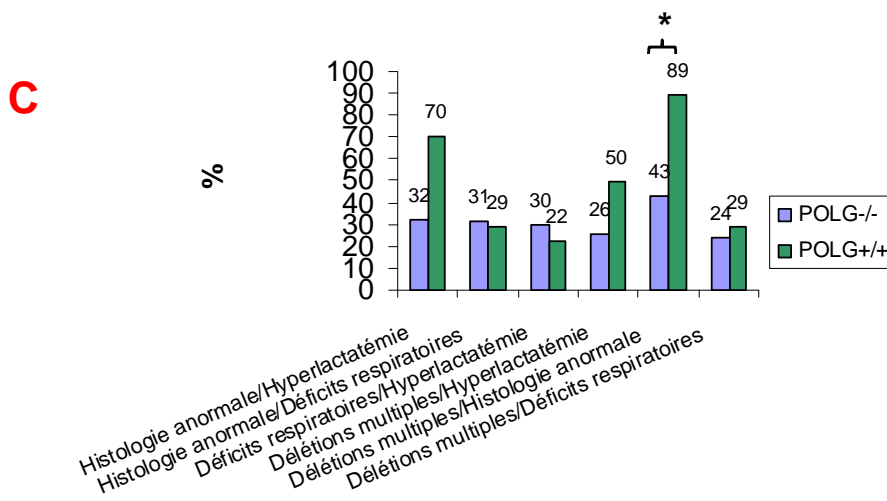


Figure 74: Associations d'investigations mitochondriales

A : Nombre de patients avec association des 2 tests (POLG^{-/-}/POLG^{+/+})

B : Nombre de patients présentant les deux tests anormaux (POLG^{-/-}/POLG^{+/+})

C : Représentation par histogramme de la fréquence des associations des différentes anomalies mitochondriales, les chiffres en haut des colonnes représentent le pourcentage de patients dans chaque groupe

*p < 0,05 avec un test exact de Fischer du fait du petit nombre d'observations

Hyperlactatémie : lactate supérieur à 1.8 mmol/L ; histologie musculaire anormale = présence de fibres COX⁻, de fibres rouges déchiquetées et/ou de fibres SDH⁺ ; déficits respiratoires = déficit isolé ou combiné des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ; délétions multiples = délétions de l'ADN mitochondrial détectées par PCR long range.

Les fréquences observées pour les 2 classes (POLG^{-/-} et ^{+/+}) sont indiquées au dessus de chaque barre de l'histogramme.

a) Imagerie

Les données d'imagerie cérébrale obtenues par résonnance magnétique étaient disponibles pour 20 patients $POLG^{+/+}$ (59%) et 43 patients $POLG^{-/-}$ (39%) ($p = 0,07$ avec un test de Chi2). Elles étaient anormales pour 65% des patients $POLG^{+/+}$ et 72% des patients $POLG^{-/-}$. Les profils anormaux comprenaient deux groupes principaux : atrophie et hypersignaux. Au sein de la population $POLG^{+/+}$ les anomalies par ordre de fréquence décroissante était la présence d'hypersignaux bilatéraux et symétriques (7 patients), une atrophie cérébelleuse ($n=6$), subcorticale ($n=4$), du tronc cérébral ($n=2$), du corps calleux ($n=2$) et enfin corticale ($n=1$). Ni la fréquence globale des anomalies d'imagerie cérébrale ni celle d'aucune des différentes altérations ne différait entre patients $POLG^{+/+}$ ou $POLG^{-/-}$.

b) Données électroneuromyographiques

Ces données étaient disponibles pour 30 patients pour le groupe $POLG^{+/+}$ (88%) et 80 pour le groupe $POLG^{-/-}$ (73%) ($p = 0,10$, test de Chi2). La sensibilité de ce paramètre est excellente puisque la totalité des patients $POLG^{+/+}$ présente un profil anormal de conduction nerveuse et la différence avec le groupe $POLG^{-/-}$ (55%) est significative ($p<0.001$, test de Chi2). Sa spécificité n'est par contre que de 45%.

c) Clinique

Les symptômes cliniques ayant permis le recrutement des patients sont détaillés dans la Figure 75. Ils sont essentiellement neurologiques comme attendu du recrutement des patients qui sont en majorité suivis dans les services de Neurologie et Neurogénétique du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière. Les principaux signes sont une neuropathie clinique, un syndrome cérébelleux, un ptosis, une ophtalmoplégie et des mouvements anormaux.

Les signes sont repris dans le Tableau 16 selon l'ordre de leur fréquence décroissante dans la population globale des patients. Les signes non-neurologiques, présents chez moins de 10% des patients, incluaient une dysphonie (8%), une rétinite pigmentaire (6%), une pseudo-obstruction gastro- intestinale (6%), une cataracte (5%) et une atrophie optique (5%).

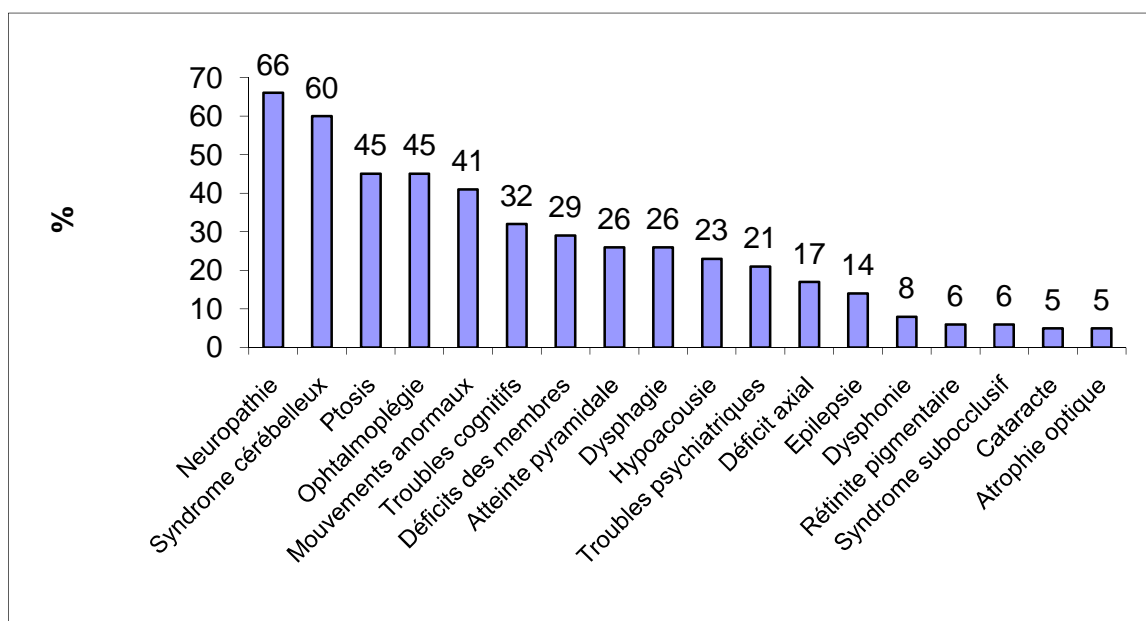


Figure 75 : symptômes cliniques au sein de notre cohorte

	POLG-/- (n=110)	POLG+/+ (n=34)	POLG+/- (n=10)	Sensibilité / Spécificité
Neuropathie	65 (59%)	32 (94%)	5 (50%)	94%/41%
Syndrome cérébelleux	64 (58%)	23 (68%)	5 (50%)	68%/42%
Ptosis	35 (32%)	28 (82%)	6 (60%)	82%/68%
Ophtalmoplégie	36 (33%)	28 (59%)	6 (60%)	59%/67%
Mouvements anormaux	40 (36%)	18 (53%)	5(50%)	53%/64%
Faiblesse musculaire	28 (25%)	19 (56%)	3 (30%)	56%/75%
Troubles cognitifs	33 (30%)	11 (32%)	5 (50%)	32%/70%
Atteinte pyramidale	35 (32%)	4 (12%)	1 (10%)	11%/68%
Dysphagie	19 (17%)	20 (59%)	1 (10%)	59%/83%
Hypoacousie	20 (18%)	10 (29%)	5 (50%)	29%/82%
Troubles psychiatriques	12 (11%)	14 (41%)	6 (60%)	41%/89%
Epilepsie	14 (13%)	6 (18%)	1 (10%)	18%/87%

Tableau 16 : Symptômes cliniques au sein des 3 groupes

(1) Comparaison entre les groupes $POLG^{+/+}$ et $POLG^{-/-}$

Pour évaluer leur valeur prédictive pour le diagnostic, nous avons calculé la sensibilité et la spécificité de chaque signe (Tableau 16). Ces deux paramètres dépendent directement de la fréquence du signe dans le groupe analysé.

Comme prévu chez ces patients recrutés pour le séquençage du gène *POLG*, plusieurs présentations cardinales précédemment associées à des mutations de *POLG* étaient fréquentes et avaient donc une bonne sensibilité. Notre approche visait à disséquer au sein des patients envoyés pour séquençage du gène *POLG*, et donc présentant des symptômes « évocateurs », ceux qui, parmi ces symptômes étaient plus spécifiques des maladies dues à des mutations du gène *POLG*.

Plusieurs signes étaient significativement plus fréquents dans le groupe $POLG^{+/+}$ que dans le groupe $POLG^{-/-}$, notamment neuropathie périphérique, ptosis, ophtalmoplégie, dysphagie, symptômes psychiatriques ($p < 0,001$ pour chaque, test de Chi2) et faiblesse musculaire ($p = 0,002$). La spécificité restait cependant insuffisante pour la neuropathie (41%) et médiocre pour le ptosis et l'ophtalmoplégie (68 et 67% respectivement).

L'atteinte pyramidale était quant à elle plus fréquente dans le groupe $POLG^{-/-}$ ($p = 0,04$).

Par ailleurs, plusieurs présentations avaient une fréquence similaire entre les deux groupes : syndrome cérébelleux ($p = 0,43$), troubles du mouvement ($p = 0,13$), troubles cognitifs ($p = 0,96$), hypoacousie ($p = 0,24$) et épilepsie ($p = 0,66$). La spécificité comme la sensibilité étaient inférieures à 70% pour tous ces signes à l'exception de l'hypoacousie (spécificité de 82%) et de l'épilepsie (spécificité de 70%).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'association de signes qui permettait d'augmenter la spécificité tout en diminuant la sensibilité. En prenant en compte les 14 signes les plus fréquents, les patients $POLG^{+/+}$ présentent de nombreux signes associés ($6,7 \pm 2,0$ par patient) par rapport aux patients $POLG^{-/-}$ ($3,7 \pm 1,8$) ($p < 0,001$) (Figure 76). L'association de ces signes 2 à 2 permet de mettre en évidence de nombreuses différences significatives entre les 2 groupes. Les données de ces associations sont exposées dans le tableau 2 des données supplémentaires de l'article mis en annexe.

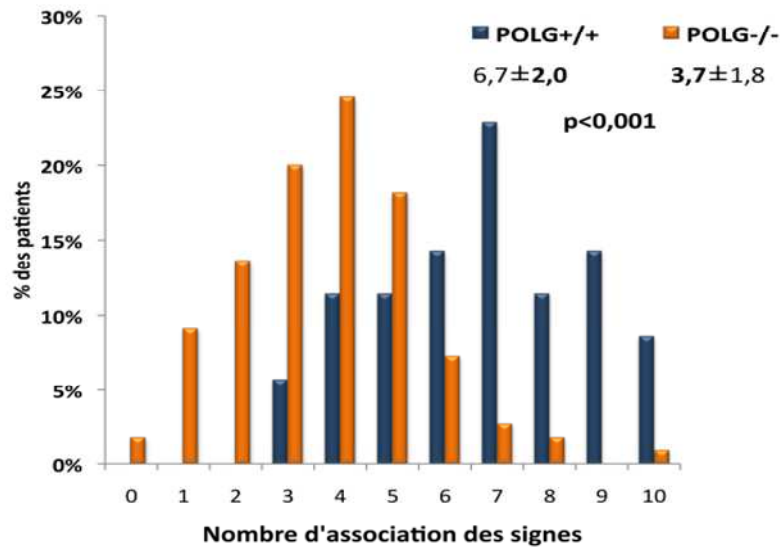


Figure 76 : Association de signes

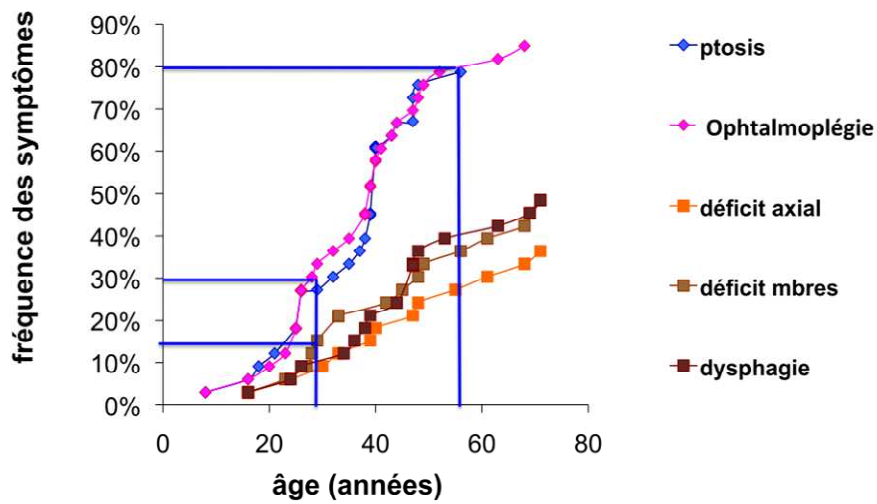


Figure 77 : Evolution clinique des patients porteurs de mutations POLG (signes musculaires)

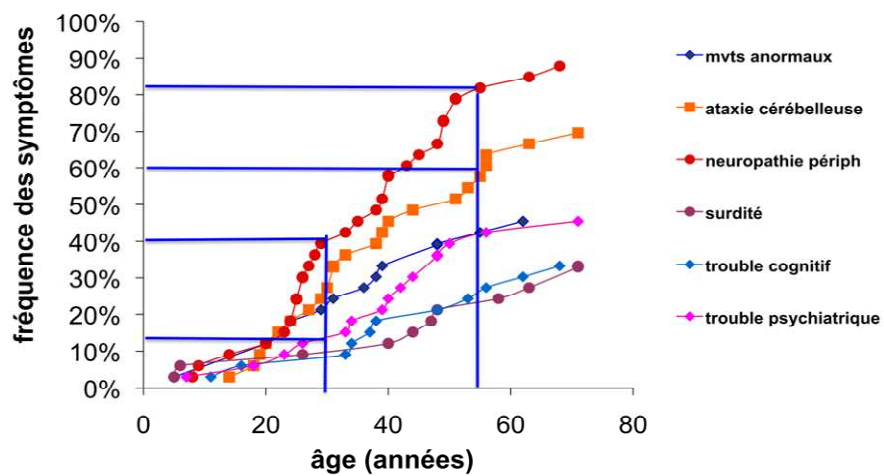


Figure 78 : Evolution clinique des patients porteurs de mutations POLG (signes neurologiques)

Alors que la neuropathie périphérique avait, comme signe isolé, une spécificité insuffisante (41%), sa présence en association avec d'autres signes est significativement associée aux mutations du gène *POLG* ($p < 0,001$ en comparaison avec le groupe *POLG*^{-/-}). Les signes associés sont surtout musculaires comme une dysphagie, une faiblesse axiale, un ptosis, une ophtalmoplégie ou une faiblesse des membres. Il peut aussi s'agir de troubles psychiatriques.

A l'inverse le syndrome cérébelleux avait une fréquence équivalente entre groupe *POLG*^{+/+} et ^{-/-}, son association à d'autres signes comme un ptosis ou des troubles psychiatriques n'augmente pas la significativité de ce signe.

L'étude de l'évolution clinique des patients au cours des années permet également de mettre en évidence la progressivité de la maladie. Les signes musculaires (Figure 77) sont présents chez 10 à 30% des patients à l'âge moyen du diagnostic, soit environ 30 ans dans les différents sous-groupes. Ils continuent d'apparaître progressivement et le ptosis et l'ophtalmoplégie, par exemple, sont retrouvés chez 80% des patients *POLG*^{+/+} vers la fin de la cinquantaine.

Les signes neurologiques (Figure 78) sont présents à l'âge moyen au diagnostic chez 10 à 40% des patients. Eux aussi continuent d'apparaître puisque la neuropathie périphérique est présente chez 80% des patients et l'ataxie cérébelleuse chez 60% des patients vers la fin de la cinquantaine.

(2) *Population POLG*^{+/+}

Deux patients seulement étaient porteurs de mutations précédemment reconnues comme pathogènes à l'état hétérozygote : le patient porteur de p.Arg943Cys a développé des signes dès l'âge de 6 ans avec tout d'abord une surdité puis l'association d'une atteinte centrale et périphérique avec aréflexie des quatre membres, hypopallesthésie, hypokinésie, myoclonies, et troubles psychiatriques. Le deuxième patient, porteur de la mutation p.Tyr955Cys, a développé un ptosis à l'âge de 16 ans puis une faiblesse musculaire axiale et proximale et une ophtalmoplégie.

Parmi les huit patients avec de nouvelles mutations de *POLG* ne touchant qu'un seul allèle, nous avons considéré la mutation comme responsable de la maladie dans deux cas (p.Gly365Ala et p.Val1177Leu). Dans les deux cas, le score de pathogénicité était à 2. Ces patients présentaient un phénotype fortement en faveur d'une atteinte *POLG*. Le premier a débuté la maladie à l'âge de 52 ans. Les investigations mitochondriales ont montré une histologie musculaire anormale ainsi que des délétions multiples de l'ADN mitochondrial. Son phénotype clinique était essentiellement neurologique avec déficit moteur, ataxie

cérébelleuse, troubles cognitifs modérés mais également ptosis. La deuxième patiente a débuté la maladie à l'âge de 32 ans. Les investigations mitochondriales ont montré une hyperlactatémie ainsi qu'un déficit respiratoire dans le muscle. Son phénotype clinique associait une atteinte musculaire avec fatigabilité, ptosis, ophtalmoplégie et une atteinte neurologique avec céphalées, appaesthésie, neuropathie, surdité, troubles psychiatriques et cognitifs.

Les six autres cas ont été considérés comme douteux. Trois d'entre eux présentaient des variants de pathogénicité difficile à établir (p.Phe88Leu, p.Gly268Ala et p.Leu392Val) malgré des scores de pathogénicité aussi élevés que pour les deux mutations précédentes. Certains éléments du phénotype clinique permettaient de douter d'une origine liée au gène *POLG* : neuropathie démyélinisante (p.Leu392Val), démarrage de la maladie par une néphropathie (p.Gly268Ala) ou encore début de la maladie avant l'âge de 1 an (p.Phe88Leu). Trois portaient une mutation habituellement récessive (p.Gly848Ser chez deux patients et p.Pro1073Lys).

C. Discussion

Dans notre étude d'une population de patients adultes présentant des signes neurologiques considérés comme évocateurs de maladie due à des mutations du gène *POLG*, nous souhaitons mettre en évidence des signes et/ou symptômes à la fois sensibles et spécifiques nous permettant de sélectionner les patients devant en priorité bénéficier du séquençage du gène *POLG*. Trouver des indications précises de séquençage du gène *POLG* sur des arguments phénotypiques avait dans un premier temps l'intérêt d'éviter aux patients des investigations invasives. A contrario, la définition de la spécificité des phénotypes associés aux mutations de *POLG* permettait d'envisager la physiopathologie de ces anomalies.

Le projet se heurtait à l'apparente diversité des phénotypes dus aux mutations de *POLG* qui recourent en outre les phénotypes de nombreuses autres maladies neurodégénératives. L'association neuropathie et ataxie est en effet rencontrée dans de nombreuses maladies comme celles du groupe dit SCA (Spino-Cerebellar Ataxia). En outre les anomalies mitochondriales observées avec les mutations de *POLG* ne sont en rien spécifiques mais peuvent se rencontrer lors de l'atteinte d'autres gènes impliqués dans la réplication de l'ADN mitochondrial, comme *PEO1* (Twinkle), *ANT1* ou *DGUOK*.

Malgré ces difficultés initiales nous avons pu démontrer l'existence de plusieurs associations de signes à la fois spécifiques et sensibles pour l'existence de mutations *POLG*.

Ce résultat a été obtenu grâce au nombre important de patients analysés (n=154). Parmi ces patients ceux ne portant pas de mutations de *POLG* ont été très importants pour l'évaluation de la spécificité des phénotypes.

Il est important de considérer le biais important de l'étude qui est la cohorte constituée essentiellement de patients adultes suivis dans des services de Neurologie. Certains signes comme l'épilepsie ou les atteintes hépatiques apparaissent nettement moins fréquents dans notre cohorte que dans des études comportant plus de cas pédiatriques {Blok, 2009 ; Horvath, 2006 ; Tang, 2011; Wong, 2008}.

Les mutations de *POLG* retrouvées dans notre étude recoupent les données de la littérature en retrouvant les mutations récurrentes dans toutes les études (p.Trp748Ser, p.Ala467Thr, p.Pro587Leu associée à p.Thr251Ile et p.Gly848Ser) {Hudson, 2006 ; Pagon, 2012 ; Tang, 2011 ; Zhang, 2011}. Nous avons aussi, comme dans la plupart des études, trouvé des mutations très variées et rares puisque rencontrées une ou deux fois dans l'étude. Ces mutations sont celles qui peuvent poser le plus de problèmes dans l'interprétation de leur lien avec les symptômes. L'établissement d'un phénotype clinique et d'altérations mitochondriales à la fois sensibles et spécifiques des mutations de *POLG* peut grandement aider cette interprétation. Par exemple la présence de signes atypiques comme un syndrome pyramidal ou le caractère démyélinisant de la neuropathie ont été des arguments importants pour exclure la responsabilité de la mutation de *POLG* dans les symptômes présentés par les patients porteurs d'une mutation sur un seul allèle du gène *POLG*.

Il est possible que les patients porteurs d'une seule mutation de *POLG* aient une autre mutation dans un gène codant pour l'une des protéines intervenant dans la réplication et la maintenance de l'ADN mitochondrial. Quelques cas de digénisme ont été rapportés comme par exemple p.Leu428Val sur *POLG* et p.Ser680Thr sur *PEOI* hétérozygotes chez un patient atteint d'ophtalmoplégie {Hudson, 2006}. Nous n'avons pas exploré cette possibilité.

L'insuffisance de spécificité et/ou de sensibilité des signes cliniques ou des paramètres biologiques pris isolément est une des conclusions principales de notre étude. Le meilleur exemple est la neuropathie périphérique dont la spécificité en tant que signe isolé n'est que de 41% mais qui augmente très significativement la spécificité des associations de symptômes pris deux à deux. Outre l'aide au diagnostic, cette constatation démontre clairement le caractère multisystémique des anomalies dues aux mutations *POLG*. Les organes touchés sont essentiellement neurologiques (centraux et périphériques) et musculaires comme le montrent

En l'absence de syndrome pyramidal bilatéral

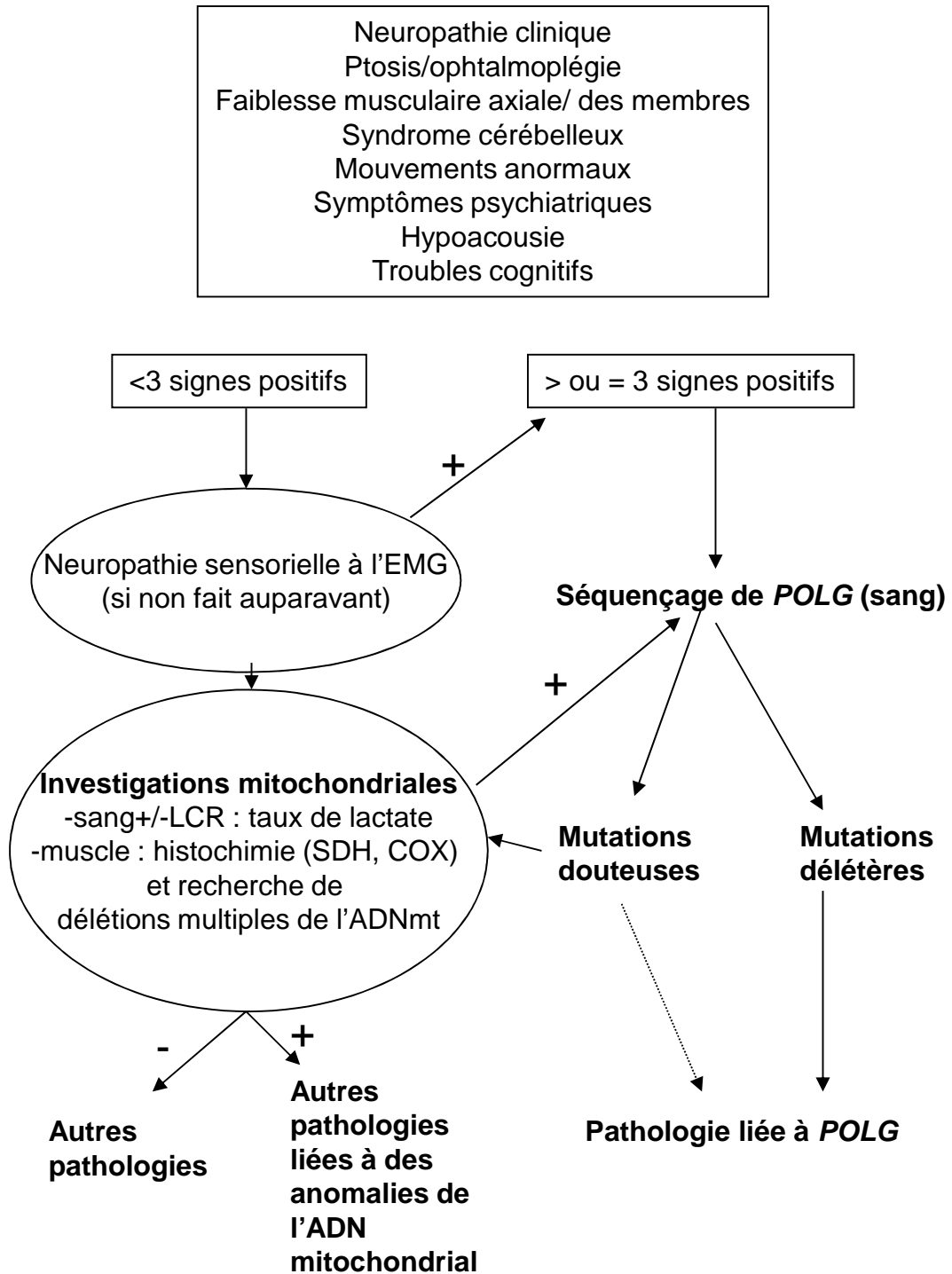


Figure 79 : Organigramme décisionnel des pathologies liées à *POLG* de l'adulte

LCR : liquide céphalo-rachidien, SDH : succinate déshydrogénase ; COX : cytochrome c oxydase

les principaux signes que sont la neuropathie périphérique, le déficit des membres, le ptôsis, l'ophtalmoplégie, la dysphagie, le syndrome cérébelleux, les mouvements anormaux, les troubles cognitifs, les troubles psychiatriques, l'hypoacousie, l'épilepsie et la cataracte.

L'évaluation de la contribution au diagnostic des paramètres d'investigation mitochondriale n'a pas été optimale du fait du grand nombre de données manquantes. Nous n'avons pas pu prendre en compte le nombre de copies d'ADN mitochondrial musculaire car ce paramètre a été mesuré chez seulement 40 patients dont 7 patients $POLG^{+/+}$. Ce paramètre est considéré comme peu fiable puisque sa normalité ne permet pas d'exclure les mutations de *POLG* particulièrement au début de la maladie {Stumpf, 2013 ; Cohen, 2010}. Le dosage des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale n'est clairement pas contributif au diagnostic puisque deux tiers des patients $POLG^{+/+}$ ne présentent aucun déficit. Cette constatation avait déjà été faite par Stumpf et al qui considéraient que ce dosage était inutile en cas de mutations du gène *POLG* {Stumpf, 2013}. La lactatémie ne semblait pas avoir de pouvoir discriminant prise isolément. Elle pourrait être utile en association avec la présence d'anomalie histologique musculaire mais ce point demande à être vérifié sur un plus grand nombre de patients.

La présence d'anomalies histologiques du muscle apparaissait comme le paramètre le plus intéressant malgré sa spécificité faible. Les anomalies histologiques de répartition mosaïque orientent clairement vers une altération, primitive ou secondaire, de l'ADN mitochondrial. Elle devrait conduire à la recherche de délétions multiples par PCR longue dont la présence oriente vers une anomalie de réplication ou de maintenance de l'ADN mitochondrial. Il est, dans ce cadre, intéressant de noter que plusieurs des patients du groupe $POLG^{-/-}$ se sont révélés atteints de ce type de maladie soit liée à une mutation sur l'ADN mitochondrial lui-même (6 patients), soit à des mutations d'un gène impliqué dans la maintenance de l'ADN mitochondrial soit *PEO1* (4 patients), *TK2* (1 patient) ou *OPA1* (1 patient).

Ce travail nous a permis d'établir un organigramme de diagnostic (Figure 79) fondé essentiellement sur les signes cliniques et électroneuromyographiques. Seuls les patients pauci-symptomatiques font l'objet d'indication pour des analyses mitochondriales complémentaires.

VI. Conclusion générale

Les maladies mitochondriales regroupent un grand nombre de pathologies dont le dénominateur commun est une atteinte de la chaîne des OXPHOS. L'étude de ces maladies s'avère complexe pour de nombreuses raisons. D'une part, la chaîne respiratoire est constituée d'une centaine de protéines et d'autre part son assemblage nécessite de nombreux facteurs, tous ces éléments pouvant être potentiellement impliqués en pathologie. De plus, son origine génétique est double rendant difficile la recherche d'une mutation causale. Sur le plan clinique, la symptomatologie et le degré de sévérité sont extrêmement variables et tous les organes peuvent être touchés de façon mono ou plurisystémique. Enfin, sur le plan biochimique, bien que certaines anomalies soient très fréquemment retrouvées comme une augmentation des rapports lactate/pyruvate ou 3-hydroxy-butyrat/acéto-acétat, d'autres sont plus inconstantes telles que des hypoglycémies parfois profondes.

La compréhension des causes de ces pathologies reste encore faible malgré de réelles avancées ces dernières décennies. Concernant ces avancées, si l'on prend l'exemple des déficits en complexe I de la chaîne respiratoire, qui sont les plus courants et les plus étudiés, de nombreux autres facteurs ont pu être impliqués en pathologie humaine depuis l'identification des 45 sous-unités. En effet, près de la moitié des patients porteurs de ce genre de déficits, ne portent pas de mutations sur les gènes codant pour ces sous-unités. L'identification de CIAFs (Complex I Associated Assembly Factors) a été basée sur le principe que ces facteurs sont présents au sein de la mitochondrie et donc font partie du catalogue élargi du protéome mitochondrial. En 2008, Pagliarini et al ont établi le profil phylogénétique du complexe I au sein de 42 espèces eucaryotes permettant notamment la validation de C8orf38 comme CIAF. Plus tard, en 2010, Calvo et al ont combiné les gènes codant pour les protéines identifiées au cours des études phylogénétiques à d'autres gènes issus de Mitocarta pour déterminer 103 gènes candidats. Le séquençage de ces 103 gènes chez 103 patients atteints de déficit en complexe I et 42 sujets sains a permis de révéler le rôle de NUBPL et FOXRED1 dans ces déficits. Enfin, en 2012, une troisième étude basée sur l'analyse de complexes intacts obtenus en Blue Native Page a montré que TMEM126B est indispensable pour la formation du complexe I {Pagliarini, 2013}. De plus, en dehors de cet exemple du complexe I, grâce à l'évolution rapide des techniques de biologie moléculaire (séquençage haut débit, séquençage de l'exome..) ces dernières années, de nombreux autres

gènes ainsi que de nouvelles mutations sur des gènes déjà connus à l'origine d'atteintes de la chaîne respiratoire ont pu être identifiés comme par exemple récemment les mutations p.Val160Ala and p.Pro233Thr sur le gène *SCO2* codant pour une protéine importante pour l'assemblage du complexe IV {Sambuughin, 2013}.

Toutefois, malgré ces avancées et bien que de nombreux gènes et mutations aient pu être identifiés comme responsables de pathologies mitochondriales, la compréhension des liens physiopathologiques entre ces derniers et les pathologies qui leur sont associées reste encore faible. De ce fait, les traitements proposés dans la prise en charge des atteintes mitochondriales restent essentiellement symptomatiques comme nous l'avons vu précédemment ; peu ont des visées correctives. Il est donc nécessaire d'augmenter les connaissances sur les liens physiopathologiques pour apporter de réelles avancées dans le traitement des maladies mitochondriales.

Nous avons donc souhaité au cours de la première partie de ce travail étudier les déficits humains en complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale qui sont à ce jour les moins étudiés comparativement aux complexes I et IV notamment. Le but de notre étude était d'essayer de dégager un profil « type » des caractéristiques de ce genre de déficit tant sur la plan clinique que biochimique et cellulaire. Pour des raisons de quantité de matériel disponible, nous ne pouvions travailler que sur les fibroblastes dérivés des patients.

Cette étude a montré des discordances d'expression tissulaire pour neuf des quinze patients avec notamment l'existence d'un déficit en complexe IV, parfois isolé, dans six des fibroblastes dérivés de patients sélectionnés parce qu'ils présentaient un déficit du complexe III dans le foie et/ou le muscle. L'association entre III et IV corrobore l'idée de l'existence de liens étroits entre ces deux complexes qui s'associent au sein de supercomplexes. Il est impossible actuellement de faire la part des choses entre un retentissement d'une anomalie du complexe III sur le complexe IV et une fonction de la protéine déficitaire qui impliquerait aussi bien le complexe III que le complexe IV mais de façon variable selon le tissu.

Nous avons identifié, en collaboration avec d'autres équipes, une mutation du gène *CYCI* qui n'avait pas été impliqué jusque-là en pathologie humaine. Nous avons également identifié une mutation de *LYRM7* qui, lui, vient d'être impliqué dans un cas de déficit en complexe III. Le petit groupe de déficits en complexe III étudié démontre de façon évidente la très grande hétérogénéité génétique de ces déficits, qui est rencontrée aussi dans les autres types de déficits. Il est probable que certains profils « type » de déficits en complexe III puissent être dégagés, notamment en fonction de l'origine génétique, si l'on dispose de séries suffisantes. Sur le plan clinique, les déficits du facteur d'assemblage BCS1L sont

responsables de tableaux très reproductibles qui permettent d'indiquer de façon claire le séquençage du gène. Nous avons observé sur les deux lignées de fibroblastes porteurs de mutations de *BCS1L* un profil particulier d'altérations biochimiques associant déficit en complexe IV et surproduction des ERO. Ce comportement particulier demande à être vérifié sur un plus grand nombre de lignées.

Après s'être intéressé aux maladies mitochondriales en prenant comme porte d'entrée de l'étude une anomalie biochimique commune, la deuxième approche de notre travail a été de prendre la question à l'inverse et de s'intéresser à la variation des pathologies dues à une anomalie génétique commune, à savoir la présence d'une mutation sur le gène *POLG*. Bien que les affections liées au gène *POLG* soient réputées comme extrêmement diverses, la classification par le gène nous a permis d'identifier des phénotypes très reproductibles au sein de la population recrutée par notre centre diagnostique, c'est-à-dire une population d'adultes présentant des signes neurologiques. L'étude a montré le caractère très multisystémique des conséquences tissulaires des mutations de *POLG*. Sur le plan du diagnostic, elle a également mis en évidence l'insuffisance de spécificité et de sensibilité de signes/symptômes pris isolément. L'analyse des associations de signes au contraire permet de différencier efficacement des pathologies pourtant proches en terme d'expression comme les atteintes liées à *POLG*, les atteintes liées à d'autres gènes de maintenance de l'ADN mitochondrial et certaines maladies neurodégénératives. Nous avons pu ainsi élaborer un organigramme décisionnel concernant l'indication d'un séquençage du gène *POLG*.

Il serait intéressant par la suite de faire de même pour tous les autres gènes de maintenance du génome mitochondrial identifiés à ce jour à savoir *PEO1*, *MGME1*, *ANT1*, *TP*, *DGUOK*, *TK2*, *MPV17*, *SUCLA2*, *SUCGL1*, *RRM2B*, *OPA1* et *FBXL4* {Copeland, 2014}. En effet, une atteinte de l'un de ces gènes altère le génome mitochondrial et ce dernier codant pour treize sous-unités de la chaîne respiratoire, 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomiaux, l'impact en terme de pathologies est considérable. Toutefois, contrairement à *POLG*, certains de ces gènes sont souvent rapportés dans la littérature dans des atteintes bien spécifiques comme *DGUOK* et atteinte hépatocérébrale chez l'enfant ou *TK2* et atteinte myopathique.

En conclusion, la classification des maladies mitochondriales par une anomalie biochimique commune, un déficit en complexe III dans le cas présent, conduit à regrouper des atteintes de causes génétiques très différentes et qui peuvent présenter des différences importantes sur le plan clinique mais aussi biochimique et du retentissement cellulaire. Au contraire, même dans des affections réputées comme extrêmement diverses comme celles

dues aux mutations du gène *POLG*, la classification par le gène atteint permet d'identifier des présentations récurrentes dans la classe d'âge étudiée, patients adultes dans le cas présent...

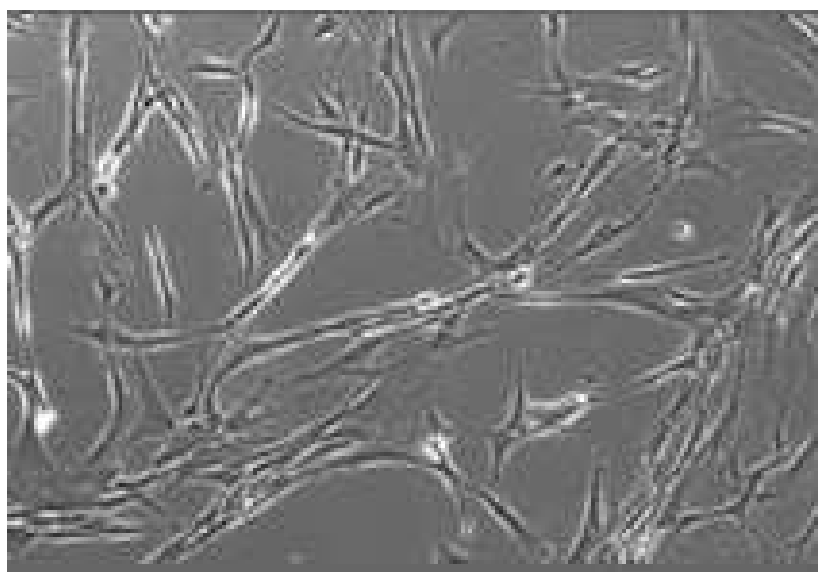


Figure 80 : Culture de fibroblastes
<http://www.eurostemcell.org>

VII. Matériel et méthodes

A. Etude des déficits du complexe III

1. Culture cellulaire et méthodes associées

a) Culture de fibroblastes

Les cultures de fibroblastes humains ont été amplifiées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, LifeTech, Invitrogen) contenant 1 g/L de glucose, 1 mM de pyruvate, 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 200 μ M d'uridine, 50 UI/mL de pénicilline, 50 μ g/mL de streptomycine et 1 μ g/mL de ciprofloxacine, à 37°C et sous 5 % de CO₂.

Les cultures de fibroblastes confluentes sont tout d'abord rincées avec un volume donné de tampon phosphate sans calcium ni magnésium (PBS) puis décollées de leur support par incubation avec de la trypsine 0,25 % - EDTA 0,02 % pendant 5 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite reprises dans un volume (équivalent à 5 fois celui de la trypsine) de milieu de culture contenant 10 % de SVF. Ce dernier permet de neutraliser l'action de la trypsine. Chaque passage est réalisé en repiquant la moitié de la flasque initiale dans une nouvelle flasque de taille égale. Ceci permet de conserver un nombre constant de divisions cellulaires par passage entre cellules de patients et cellules témoins.

b) Préparation de culots secs

Après avoir été décollées par la trypsine et récupérées dans le milieu de culture, les cellules peuvent être culotées par centrifugation 10 minutes à 2000 rpm (600 g). Elles sont ensuite remises en suspension dans du PBS afin d'être rincées et centrifugées de nouveau à 5000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite retiré et le culot congelé à -80°C.

c) Cryocongélation

Les cellules issues des premiers passages sont congelées afin de constituer une réserve de cellules jeunes. Dans ce cas, après une centrifugation à 2000 rpm pendant 10 minutes, les cellules d'une flasque de 75 cm² sont reprises dans un millilitre de milieu DMEM additionné de 20% de SVF et 10% de diméthylsulfoxyde. La préparation cellulaire est ensuite conservée

au moins une nuit dans une boîte à isopropanol dans un congélateur à -80°C pour permettre une diminution progressive de la température. Elle est ensuite stockée dans de l'azote liquide.

d) **Immortalisation par le gène de la télomérase**

La plupart des fibroblastes utilisés dans notre étude étaient des fibroblastes primaires. Toutefois, pour trois patients, nous avons utilisé des fibroblastes immortalisés que le laboratoire avait en sa possession.

Les cellules PAhT sont des fibroblastes murins producteurs de rétrovirus portant le vecteur pBABE qui code la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (hTERT) {Aure, 2007 ; Bodnar, 1998}. Les cellules PAhT sontensemencées de façon à être à environ 70 % de confluence quand le surnageant est collecté. Les cellules à immortaliser sontensemencées pour être à environ 50-60 % de confluence lors de l'addition du rétrovirus.

Toutes les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM complet à 4,5 g/L glucose.

- Transfection

Le surnageant est prélevé sur les cellules PAhT puis additionné de polybrene 4 µg/mL. Ce milieu est déposé sur les cellules à immortaliser 2 fois par jour pendant 3 jours successifs.

- Sélection

La sélection commence après les 3 jours de transfection et se fait par la puromycine à 1 µg/mL que l'on maintient pendant 10 jours en changeant le milieu 2-3 fois /semaine {Agier, 2010}.

e) **Préparation de fractions enrichies en mitochondries à partir de fibroblastes en culture**

Les cellules d'une flasque de 175 cm² confluente sont trypsinisées selon le protocole habituel. Le culot est ensuite repris avec 1 ml de milieu « HB » (sucrose 250 mM, Hepes pH 7,4 10 mM). Une homogénéisation est alors réalisée en resuspendant ce culot par 25 allers-retours à travers une aiguille G22 (diamètre 0.7mm, longueur 30 mm) montée sur une seringue de 1 ml. La rupture d'une grande majorité de cellules est vérifiée par observation au microscope d'une goutte sur lame avant et après homogénéisation. Une centrifugation de 10 minutes à 1000 g et à 4°C permet ensuite d'éliminer les débris cellulaires, noyaux et cellules entières. Le surnageant est récupéré et centrifugé pendant 10 minutes à 11000g et à 4°C.

Enfin le culot est repris dans 100 µl de PBS, les protéines sont mesurées sur 5 µl de cette préparation et le reste est aliquoté par 300 µg.

f) Méthode de dosage des protéines

Les protéines sont dosées par le kit « Pierce BCA Protein Assay kit » (Thermoscientific®). Il s'agit d'un kit utilisant l'acide bicinchoninique (BCA) pour la détection colorimétrique et la quantification des protéines. Cette méthode combine la réduction du Cu^{2+} en Cu^{1+} par les protéines en milieu alcalin (réaction de Biuret) et la détection colorimétrique du cation Cu^{1+} grâce au BCA. La réaction colorimétrique est due à la chélation de deux molécules de BCA par un cation Cu^{1+} .

g) Extraction d'ADN

Les cellules récoltées à partir d'une flasque de 75 cm² confluente sont reprises dans 500 µL de tampon de solubilisation RSB + 1 % SDS (Tris HCl 10 mM à pH 7,5, NaCl 10 mM, EDTA 25 mM, SDS 1 %). 10 µL de protéinase K à 20 mg/mL sont ajoutés pour lyser les protéines et le tout est incubé 2 heures à 50°C ou une nuit à 37°C. La précipitation de l'ADN est induite par addition de 50 µL de NaCl 5M et 500 µL d'isopropanol (gardé à -20°C). Le tout est alors incubé à -20°C durant la nuit. Une centrifugation de 20 minutes à 15 000 rpm et à 0-4°C permet de récupérer le culot d'ADN qui est lavé avec 500 µL d'éthanol 70 % (gardé à -20°C), séché à l'air à température ambiante, puis repris dans 30 µL de tampon TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) et 1 µL de RNase A à 1 mg/mL. La dissolution du culot peut parfois nécessiter de chauffer l'échantillon 10 minutes à 70°C et/ou d'ajouter 20 µL de TE. L'ADN obtenu est conservé à -20°C.

h) Méthode de dosage des acides nucléiques

La densité optique des échantillons est lue avec un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, USA) à 260 nm (longueur d'onde d'absorption des bases puriques et pyrimidiques) et à 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) afin de s'assurer de la pureté des échantillons. La concentration des acides nucléiques est calculée à partir de leur absorbance à 260 nm sachant qu'une unité de densité optique correspond à 40 µg d'ARN ou à 50 ng d'ADN. Leur pureté est évaluée par le rapport des densités optiques à 260 nm et 280 nm sachant que ce rapport doit être à 2.0 pour les ARN et à 1.8 pour les ADN.

2. Analyses biochimiques

a) Mesures spectrophotométriques des activités résiduelles des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sur tissus ou fibroblastes

Les mesures d'activité sont effectuées sur des culots secs de fibroblastes ou des homogénats obtenus à partir de biopsies musculaires ou hépatiques. Les dosages des complexes sont effectués sur un spectrophotomètre Beckman Coulter DU 800 à 37°C selon la technique de référence sur le territoire national {Medja, 2009}. La BSA utilisée est toujours la forme purifiée sans acides gras (fatty acid free BSA) pour avoir une liaison efficace aux acides gras tissulaires. Les lectures sont toujours précédées d'une calibration sur l'air.

(1) Préparation de culots secs en vue des dosages spectrophotométriques

La préparation des échantillons est effectuée à 0-4°C (tampon, homogénéiseurs et tubes pré-refroidis dans de la glace pilée, homogénéiseur maintenu dans la glace pilée durant l'homogénéisation). Les culots secs de fibroblastes sont repris dans 200 µl de tampon « mannitol » pour un culot obtenu à partir d'un falcon de culture T75.

Composition du tampon «mannitol» :

- 225 mM mannitol
- 75 mM saccharose
- 10 mM Tris HCl pH 7,2
- 0,1 mM EDTA

Les suspensions cellulaires sont ensuite homogénéisées par sonication à puissance moyenne pendant 5 secondes. Après le dosage des protéines la suspension cellulaire est diluée avec du tampon « mannitol » de façon à avoir une concentration protéique finale de 2 mg/ml.

(2) *Préparation d'homogénats tissulaires post-nucléaires en vue des dosages spectrophotométriques*

La préparation des échantillons est effectuée à 0-4°C comme précédemment. Un fragment de biopsie d'environ 20 mg est déposé dans un potter en verre rodé, à fond conique, contenant 200 µl de tampon « mannitol ». L'homogénéisation se fait à l'aide d'un piston également en verre rodé et d'un polybroyeur (500 à 1000 rotations par minute). Le piston est rincé avec 100 µl de tampon « mannitol » qui sont ajoutés dans le potter. L'ensemble est transféré dans un tube Eppendorf et centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à 650 g. Le surnageant est récupéré et le culot est repris avec 200µl de tampon mannitol et traité de la même manière que précédemment. Les deux surnageants sont réunis et la concentration protéique ajustée à 2 mg/ml avec du tampon mannitol.

(3) *Mesure des activités de la chaîne respiratoire et de la citrate synthase*

Ces activités ont été mesurées en suivant exactement les protocoles détaillés dans l'article de Medja et al {Medja, 2009}. Ils ne seront donc pas détaillés ici.

3. Méthodes électrophorétiques

a) Méthode électrophorétique en conditions dénaturantes

L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées au travers d'un polymère sous l'effet d'un champ électrique. Nous avons utilisé la technique du SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamid Gel Electrophoresis). Celle-ci a été décrite pour la première fois en 1970 {Laemmli, 1970}. Le sodium dodecyl sulfate (SDS) est un détergent anionique qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives. Ces charges se repoussent et déplient les chaînes polypeptidiques. Le fait que les protéines soient toutes chargées négativement permet une migration en fonction de leur masse moléculaire uniquement.

Protéine	Type	Masse moléculaire (kDa)	Dilution Ac I	Provenance Ac I	Ac II (singe)	Révélation
Core 2	CIII	48	1/1000	Dr C.Godinot	Anti-lapin	Pico
ISP	CIII	30	1/1000	Dr C Godinot	Anti-lapin	Pico
Prx 3	Stress ox	26	1/10000	Abcam	Anti-lapin	Millipore
SOD2	Stress ox	25	1/500	Sigma-aldrich	Anti-souris	Millipore
3-NT	Stress ox	Bandes multiples	1/1000	Molecular Probes	Anti-lapin	Millipore
Porine	Témoin	31	1/5000	Mitosciences	Anti-souris	Pico
Actine	Témoin	42	1/5000	Sigma-aldrich	Anti-souris	Pico

Tableau 17: Western Blot: protéines étudiées et natures des anticorps
 ISP : Iron Sulfur protein ; Prx : peroxyredoxine ; SOD2 : superoxyde dismutase 2 ; 3-NT : 3-nitrotyrosine ; Ass CIII : assemblage CIII ; stress ox : stress oxydant ; PM : Poids Moléculaire , Ac : anticorps
 Pico : réactif ECL Pico (Super Signal West Pico, ThermoScientific®)
 Millipore : réactif Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)

(1) Tampons et réactifs

- Tampon échantillon : SDS 8%, Glycérol 20%, PMSF (PhenylMethylSulfonyl Fluorid) 2 mM, Bleu de Bromophénol 0.005%, Tris –HCl (pH 6.8) 62.5 mM
- Tampon SDS-PAGE : Tris 250 mM, Glycine 1.9 M, SDS 1%
- Tampon de transfert : CAPS 2,21 g/l, alcool 95°C 10% et NaOH 10 mM.

(2) Préparation des échantillons pour le Western blot

Le dosage des protéines se fait avec le kit « Pierce BCA Protein Assay kit » (Thermoscientific, cf Paragraphe IV-B-2-B-4).

Les échantillons sont solubilisés dans le tampon d'échantillon de façon à avoir un rapport SDS/protéines égal à 30 :

Pour X µg de protéines, ajouter Y µl de tampon d'échantillon

$$Y = (X \cdot 30) / 80$$

La solubilisation se fait sur la nuit à température ambiante puis en chauffant les échantillons durant 10 minutes à 65°C.

(3) Electrophorèse

Les échantillons ainsi qu'un témoin de masse moléculaire (10 µL de Pageruler Prestained Protein Ladder, Fermentas®) sont déposés sur un gel (Criterion TGX, Precast Gel 4-20%, Biorad).

Si des dilutions successives sont effectuées, elles le sont dans le tampon d'échantillon avant le dépôt dans le gel.

La migration est effectuée à 100 Volts pendant 30 minutes puis à 150 Volts jusqu'à ce que le témoin de charge arrive en bas du gel.

(4) Transfert

Le transfert se fait sur membrane de nitrocellulose (Whatman, Protran®, 0,2 µm) à 70 Volts pendant 30 minutes.

La quantité de protéines et la qualité du transfert sont contrôlées par coloration au rouge Ponceau S 0,1% dans de l'acide acétique 5% (Aldrich®).

(5) Immunorévélation

La membrane de nitrocellulose est saturée durant 30 minutes à température ambiante avec 5% de lait écrémé.

Les protéines recherchées et les anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau 17.

Les membranes sont lavées trois fois avec du PBS 1X, Tween 20 0,1% puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch®) et dilué au 1/5000 dans du lait écrémé 2% pendant 1 heure à température ambiante. Elles sont alors à nouveau lavées trois fois avec du PBS 1X, Tween 20 0,1%.

La révélation se fait ensuite soit avec le réactif ECL Pico (Super Signal West Pico, ThermoScientific®) soit avec le réactif Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore®) et la lecture se fait sur le GeneGnome (Ozyme®) par le logiciel Genesnap (Syngene®). Les signaux sont quantifiés par le logiciel Genetools (Syngene®).

Applications :

Cette technique a été utilisée pour plusieurs approches au cours de notre étude : analyse de sous-unités du complexe III (Core 2, ISP) et d'un facteur d'assemblage (LYRM7), analyse du stress oxydant (peroxyredoxine 3 et SOD2) et étude de la répartition tissulaire des complexes chez la souris.

b) Oxyblot

Les ERO sont capables d'induire des modifications oxydatives des protéines ; des groupements carbonyle sont introduits au niveau des chaînes latérales des protéines {Stadtman, 2006}. Pour la détection de ces groupements, il est nécessaire de traiter chimiquement les échantillons dès leur obtention et avant congélation. Le principe de la détection des groupements carbonyles repose en effet sur leur dérivation par la 2,4 dinitrophenylhydrazine

(DNPH) en dinitrophenylhydrazone qui est ensuite reconnue par des anticorps spécifiques. Selon le protocole fourni par le fabricant (kit OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit, Millipore®), 20 µg de protéines sont solubilisées dans 3% SDS, 0,5X d'une solution de DNPH fournie dans le kit et l'ensemble est incubé durant 15 min à température ambiante. La réaction est ensuite arrêtée avec la solution de neutralisation fournie dans le kit. Les échantillons peuvent ensuite être conservés à -80°C jusqu'à leur analyse par western blot. L'anticorps primaire est dilué au 1/150^{ème}. L'anticorps secondaire est de l'anti-lapin toujours utilisé à la dilution 1/5000^{ème}. La révélation se fait avec le réactif ECL Pico (Super Signal West Pico, ThermoScientific®).

c) Méthodes électrophorétiques en conditions natives

La méthode d'électrophorèse en conditions natives ou Blue Native-PAGE permet la séparation par taille des édifices protéiques sans altérer d'éventuelles interactions entre protéines partenaires {Schagger, 1991}. Elle permet ainsi de séparer les cinq complexes de la chaîne respiratoire les uns des autres sans dissocier leurs sous-unités constitutantes. Le Serva blue G250 utilisé dans cette technique permet de charger négativement les protéines en se liant notamment aux résidus arginines accessibles. La liaison d'un grand nombre de ces charges négatives facilite non seulement la migration des complexes mitochondriaux mais réduit considérablement la tendance des protéines à s'agréger.

(1) *Tampons et réactifs*

- ACBT : 1.5M acide aminocaproïque; 75mM Bis-Tris
- Digitonine 4mg/ml
- Laurylmaltoside 10%
- Tampon cathode A (50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris, 0.02% Serva Blue G) : solution 10 X
- Tampon cathode B (50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris) : solution 10 X
- Tampon anode (50mM Bis-Tris) : solution 10X
- Tampon de transfert : 25mM Tris, 192 mM glycine, 0.02% SDS
- Native-Page 4 X sample buffer (Invitrogen)
- Native-PAGE 5% G-250 sample additive (Invitrogen)

Incubation	Membrane	Complexe OXPHOS	Anticorps I	Dilution Acl	Provenance Acl	Anticorps II 1/5000	Masse moléculaire du complexe (KDa)
1	1	Complexe I	ND1	1/1000	Dr C Godinot	Lapin	1000
1	2	Complexe IV	Cox 2	1/2000	Dr C Godinot	Lapin	250
2	1	Complexe III	Core 2	1/2000	Abcam	Souris	600
2	2	Complexe V	CV Beta	1/2000	Abcam	Lapin	700
3	1	Complexe II	70kD	1/5000	Abcam	Souris	150
3	2	Complexe II	70kD	1/5000	Abcam	Souris	150

Tableau 18 : Anticorps utilisés pour le Blue Native Page

(2) Préparation des échantillons

Les fibroblastes, utilisés sous forme de culots secs (Cf paragraphe III-B-3-a), sont traités avec de la digitonine, un détergent non-ionique. Cette substance dissocie les membranes contenant du cholestérol : membranes plasmiques et membranes externes des mitochondries. Après centrifugation, le culot contiendra une fraction enrichie en mitoplastes.

Les complexes OXPHOS sont extraits de la membrane interne des mitochondries avec du β -laurylmaltoside et de l'acide amino-caproïque. Le premier est un détergent doux qui solubilise la membrane interne mitochondriale et le deuxième est une molécule zwitterionique qui a un rôle protecteur et permet le maintien des complexes dans leurs conformations natives sans affecter l'électrophorèse.

(3) Isolement de la fraction des mitoplastes

Le culot est resuspendu dans 100 μ l de PBS auxquels sont ajoutés 100 μ l de digitonine à 4 mg/ml (concentration finale 2 mg/ml). La suspension cellulaire est alors laissée dans la glace pendant 10 minutes. 1 ml de PBS 1X froid est ensuite ajouté afin de diluer la digitonine. Le tout est centrifugé 10 minutes à 4°C à 16000 g. Le surnageant est éliminé et un second lavage est fait avec 1 ml de PBS 1X froid en centrifugeant 5 minutes à la même vitesse.

(4) Isolement des complexes OXPHOS

Le culot est remis en suspension dans 40 à 60 μ l de tampon ACBT (selon la taille du culot) auxquels sont ajoutés 3 μ l de laurylmaltoside 10% pour 10 μ l de solution. La solution est alors laissée dans la glace pendant 10 minutes. Le tout est centrifugé 30 minutes à 4°C à 16000 g. Le surnageant contenant les complexes est ensuite transvasé dans un nouveau microtube. 10 μ l de la solution sont mis de côté pour réaliser le dosage des protéines (kit « Pierce BCA Protein Assay kit », ThermoScientific, cf Paragraphe IV-B-2-d).

Un quart de volume de Native PAGE 4X sample buffer (Invitrogen) est enfin ajouté dans la solution de protéines et le tout peut être conservé à -80°C jusqu'au moment de l'utilisation.

(5) Dépôt

Les gels utilisés sont les suivants : Native Page 4-16% Bis-tris Gel (Invitrogen).

Les solutions protéiques sont décongelées dans la glace. La quantité nécessaire pour 2 dépôts, soit 30 µg de protéines (15 µg de protéines par puits) est prélevée puis le reste peut être immédiatement recongelé. 1/12 de volume de bleu G250 (NativePAGE 5% G-250 sample additive) est ajouté juste avant de charger le gel.

(6) Migration

Une fois le gel mis en place dans la cuve, sont ajoutés 200 ml de tampon de cathode A entre les 2 gels et 500 ml de tampon d'anode à l'extérieur (à la hauteur d'environ 1/3 du gel). Les conditions d'électrophorèse sont : 30 min à 80V puis 2 heures environ à 100V (jusqu'à ce que le front de migration soit vers le milieu du gel). Le tampon de cathode A est ensuite remplacé par le tampon de cathode B et une nouvelle migration à 150V pendant environ 2 h est mise en route (jusqu'à ce que le front bleu atteigne la fin du gel).

(7) Transfert

Le transfert est réalisé sur une membrane PVDF (0.45µm). Elle est activée une minute dans le méthanol puis maintenue dans du tampon de transfert.

Un « sandwich » est préparé de la façon suivante : éponge, 2 papiers Whatman, gel, membrane PVDF, 2 papiers Whatman, éponge.

Le transfert se fait dans du tampon (25mM Tris, 192 mM glycine, 0.02% SDS) pendant 1 h 30 à 100V. Les membranes sont ensuite rincées à l'eau distillée, incubées dans de l'acide acétique 8% pendant 10 minutes et rincées 3 fois au PBS Tween 0.05% pendant 5 minutes.

(8) Saturation

La saturation se fait par incubation des membranes dans une solution de saturation (Lait écrémé 5% dans PBS Tween) 1 heure à T° ambiante ou la nuit à 4°C.

Gène	Localisation/ Taille (kbases)/ Nombre d'exons	Amorces	
<i>CYC1</i>	Chr. 8/6.469/7	Exon 1	CCACGACAACCCGAAGAG (58°C) / CGTGACCTTCACGGAGATG (60°C)
		Exon 2-3	TGAGAGTCAGATCCCCAGGT (62°C) / ACCGAGAGCCTCATCACAAAC (62°C)
		Exon 4-5	CAGGGTTGTGATGAGGCTCT (62°C) / CAGGAACACAGGGAAGCAT (57°C)
		Exon 6-7	AGGTTGGACATGAGCCTGAG (62°C) / GGCAAGGGCTTGGTATCAG (62°C)
<i>UQCRF51</i>	Chr. 19/9.970/2	Exon 1	GTTGGAAGGTCGTCCCTGT (60°C) / GAGGAGGAACAGGCGAAG (62°C)
		Exon 2a	TCCATAAAGGGCTATTTCTCTGA (46°C) / GTGGGTCCTCAACTGTGAT (62°C)
		Exon 2b	ACCCCTGTTTGTGCGTCAT (58°C) / CAAGTACAGAAGGCTTCTCTCA (50°C)
		Exon 2c	GATCAGATTGGGTCCTGCTC (62°C) / GGGCAAGAAAATAAGTCAGTTACA (48°C)
<i>LYRM7</i>	Chr.5/38,479/5	Exon 1	TTACCAGTCCCATCCGTTT (55° C) / ATCGTACCCACCCCTTCC (58° C)
		Exon 2	AAGCGATCTGTACCTCAA (57° C) / TGACCACACAGGGTTTCTCA (57° C)
		Exon 3	GCCATTCTAGTGAATAATGTGTCA (58° C) / CCCCTCTATCTTCATATTCC (58° C)
		Exon 4	CCTAAAGGACTTACTCTATTTGTTTGG (60° C) / TGTCTGGCAAAATCAAGCTG (55° C)
		Exon 5	AGGGGGAAATGAGTGTCTT (57° C) / ATGCCAGTTCAGGGAATG (55° C)
<i>BCS1L</i>	Chr.2/7.788/9	Exon 3	GTCCAATTCTAATCTGTGCTT(60,5°C)/CTGAGTGAGTGAATGGGTC(62,7°C)
		Exon 4	GGAGGGCTGTGAGAGTAG(63,9°C)/CGGCCTGCTTATTCAC(62,9°C)
		Exon 5	AGAAGGAAGCTGTTGGCA(61,6°C)/TTGGACTAGAGCTTTATATCACCC(62,4°C)
		Exon 6	TGTGTATGAGAATGATTTATTTCCGT(60,4°C)/ACCCTATCAGCCTAGTGT61,7°C)
		Exon 7	TCAGGCCTCTGAGACAC(62,9°C)/CCAGGCATCTTCCACCA(62,9°C)
		Exon 8	GAGCCACACAAGACACAT(61,7°C)/CAGGGAAGCAGGTTCAC(62,9°C)
		Exon 9	TTAGGCAAGAGCCACC(62,9°C)/GTGATTGCAGCCGCTTA(62,7°C)
<i>UQCRB</i>	Chr.8/12.559/5	Exon 4	TAGTGATTTGAATTCGATAGTTCACC(61.3°C)/CGGAAATAACATTGCTTTATTA ACCTC(61,3°C)
		Exon 5	GTTATTGAAGACCTGTTGAGTG(61,5°C)/CCAGCCATTACAATAGACATTATTTA (60,4°C)
<i>UQCRQ</i>	Chr.5/6.218/3	Exon 2	CTGGGCTGGGAAAGGATAA(62,7°C)/ATGAGAAAGGTGTGTACGG(61,6°C)
		Exon 3	AAAGAAGACAAGAGGACTGAG(61,5°C)/TGAATATTAGTGGTCACACAGG(61,5°C)
<i>MT-CYB</i>	Mitochondrial 14747- 15887/1.141/1	F14671- 14688/R151 93-15209	CATTATTCTCGCACGGAC(71,7°C)/TGGGATGGCGGATAGTAAG(72,8°C)
		R15193- 15209/R155 96-15614	CAGCCTTCATAGGCTATGT(71,7°C)/CTCCTAGTTGTAGGGACG(72,7°)
		F15522- 15539/R159 29-15950	GCCAGTCCAACCCCTTAAACACCC(72,9°C)/TCCTTGGAAAAAGGTTTCATCT(70, 4°C)

Tableau 19 : Gènes séquencés et amorces utilisées

Pour les gènes *BCS1L*, *UQCRB*, *UQCRQ* et *MT-CYB*, les amorces sont additionnées des queues M13 : TGTAACGACGGCCAGT (F) et CAGGAAACAGCTATGACC (R)

(9) Immunorévélation

Les anticorps sont dilués dans la solution de saturation. Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires aux dilutions indiquées dans le tableau 18 durant 2 heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. 3 lavages sont ensuite effectués au PBS/tween. Les membranes sont alors incubées avec les anticorps secondaires aux dilutions indiquées dans le tableau 18 durant 2 heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Enfin 3 lavages sont effectués au PBS/tween.

La révélation est faite par le réactif SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) qui comprend du peroxyde couplé à un réactif chimioluminescent et qui va réagir avec la peroxydase de raifort couplée à l'anticorps secondaire. La lecture se fait sur le GeneGnome (Ozyme®) par le logiciel Genesnap (Syngene®) toutes les 30 secondes pendant 3 minutes. Les signaux sont quantifiés par le logiciel Genetools (Syngene®).

4. Etude moléculaire : séquençage par méthode de Sanger

Les gènes codant pour cinq sous-unités du complexe III dont les trois sous-unités catalytiques (*MT-CYB*, *CYC1*, *UQCRFS1*, *UQCRQ* et *UQCRB*) ainsi que les gènes codant pour deux facteurs d'assemblage ont été séquencés (*BCS1L* et *LYRM7*).

Les gènes *CYC1*, *UQCRFS1* et *LYRM7* ont été séquencés à la plateforme de séquençage de l'Institut Cochin.

Le séquençage de *UQCRB* a été réalisé et décrit par {Haut, 2003} pour le Patient 1. Le Patient 3 a été diagnostiqué lors de la première identification de l'implication de *BCS1L* dans un déficit en complexe III {de Lonlay, 2001}. Concernant ces deux gènes, le séquençage a ensuite été effectué pour tous les autres patients dans le cadre du diagnostic au centre de génétique de la Pitié-Salpêtrière de même que *MT-CYB* et *UQCRQ* pour les 15 patients.

Quatre patients (P5, P8, P9 et P11) ont également bénéficié d'une étude de tout l'exome réalisé par l'équipe du Dr Holger Prokisch à l'Institut de génétique humaine de Munich.

Le nombre d'exons, la localisation, la taille de ces gènes et les amorces utilisés pour le séquençage sont répertoriés dans le tableau 19.

Pour les gènes *CYC1*, *UQCRFS1* et *LYRM7*, le choix des amorces a été fait à l'aide du logiciel Primer 3 et leur qualité vérifiée avec Oligoanalyzer. Pour les quatre autres gènes, les amorces ont été sélectionnées grâce au logiciel LightCycler® Probe Design Software 2.0. Les

Gène	Exon	Dénaturation	Cycles (1)Dénaturation (2)Hybridation (3)Elongation	Cycles (1)Dénaturation (2)Hybridation (3)Elongation	Extension finale Refroidissement
<i>CYC1</i>	Exon 1 et 4+5	95°C / 5min	40 cycles 95°C / 30sec 45°C+ 0,5°C par cycle / 30 sec 72°C / 30sec		72°C / 7min 4°C / ∞
	Exon 2+3 et 6+7	94°C / 10min	10 cycles 94°C / 30sec 60°C-1°C par cycle / 30 sec 72°C / 30sec	40 cycles 94°C / 30sec 50°C / 30sec 72°C / 30sec	72°C / 10min 4°C / ∞
<i>UQCRFS1</i>	Exon 1	95°C / 5min	40 cycles 95°C / 30sec 45°C+0,5°C par cycle / 30 sec 72°C / 30sec		72°C / 7min 4°C / ∞
	Exon 2 Fragment a	94°C / 10min	10 cycles 94°C / 30sec 65°C - 1°C par cycle / 30 sec 72°C / 30sec	40 cycles 94°C / 30sec 55°C / 30sec 72°C / 30sec	72°C / 10min 4°C / ∞
	Exon 2 Fragments b et c	94°C / 10min	10 cycles 94°C / 30sec 61°C - 1°C par cycle / 30 sec 72°C / 30sec	40 cycles 94°C / 30sec 51°C / 30sec 72°C / 30sec	72°C / 10min 4°C / ∞
<i>LYRM7</i>	Tous les exons	94°C / 10min	10 cycles 94°C / 30sec 65°C - 1°C par cycle / 30 sec 72°C / 30sec	40 cycles 94°C / 30sec 55°C / 30sec 72°C / 30sec	72°C / 10min 4°C / ∞
<i>BCS1L, UQCRB, UQCRQ</i>	Tous les exons	95°C / 5 min	10 cycles 95°C / 30sec 65°C-55°C (-1°C par cycle) / 30 sec 72°C / 30sec	40 cycles 95°C / 30sec 55°C / 30 sec 72°C / 30sec	72°C / 10min 20°C / 10 min
<i>MT-CYB</i>	3 fragments	95°C / 5 min		40 cycles 95°C / 30 sec 60°C / 45 sec 72°C / 45 sec	

Tableau 20 : Programmes d'amplification PCR

amorces utilisées pour ces gènes comportaient toutes une queue M 13 à l'exception de celles utilisées pour *UQCRQ*.

Quatre mélanges réactionnels de PCR ont été utilisés.

Pour les exons 2+3, 6+7 de *CYCI*, les fragments 2a, 2b et 2c de *UQCRFSI* et tous les exons de *LYRM7*, le mélange était le suivant :

- 0,25 U AmpliTaq Gold PCR® (Applied Biosystem),
- dNTP 100 μ M,
- Tampon d'amplification fourni par le fabricant de la Taq (sans magnésium) 1 X,
- 1,75 mM $MgCl_2$,
- 1 μ M de chaque amorce spécifique
- eau stérile qsp 20 μ L.

Pour les exons 1 et 4+5 de *CYCI* et l'exon 1 de *UQCRFSI*, est utilisé un kit de PCR GC Rich avec le mélange réactionnel suivant :

- 2U de FastStart Taq Roche®
- dNTP 200 μ M,
- Tampon d'amplification fourni par le fabricant de la Taq (sans magnésium) 1X,
- 1,5 mM $MgCl_2$,
- GC RICH Solution 1 X,
- 1 μ M de chaque amorce spécifique
- eau stérile qsp 50 μ L.

A ces mix réactionnels sont ajoutés 2 μ l d'ADN génomique cible dilué à 50 ng/mL.

Le mélange réactionnel de PCR pour les autres gènes nucléaires est le suivant :

- AmpliTaq Gold PCR (Applied Biosystem) 1u/ μ l,
- dNTP 1 mM,
- tampon (avec $MgCl_2$) 1 X,
- qsp 24,65 μ l dans de l'eau stérile,
- 0.2 μ M de chaque amorce spécifique
- Et enfin 1,5 μ l d'ADN à 50 ng/ μ l.

Pour le cytochrome b, le mélange réactionnel de PCR est quasi identique (qsp 24,15 μ l), lui sont ajoutés 0.8 μ M d'amorces sens et antisens et 1 μ l d'ADN à 50 ng/ μ l.

Les différents programmes d'amplification sont rapportés dans le tableau 20.

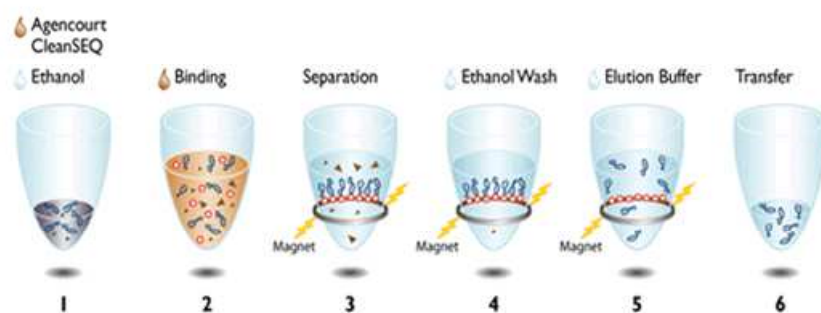


Figure 81 : Etapes de purification des réactions de séquence (Agencourt Cleanseq)

PROGRAMME SEQUENCES				
	Dénaturation	98°C	1 min	
1 étape	Dénaturation	98°C	10 sec	25 cycles
	Hybridation	55°C	15 sec	
	Elongation	60°C	4 min	

Tableau 21 : Programmes de séquençage
(BCS1L, UQCRB, UQCRQ et MT-CYB)

Les produits de PCR destinés à être séquencés à la plateforme de génomique de l'institut Cochin sont ensuite purifiés sur colonne avec le kit Qiaquick (Quiagen®) en plusieurs étapes : dépôt sur la colonne d'un volume de PCR et de 5 volumes de solution PB, centrifugation 1 minute à 13000 rpm (18000 g), élution par ajout de 750 µl de PE et centrifugation 1 minute à 13000 rpm (18000 g), ajout de 30 ou 50 µL de tampon EB en fonction de la quantité de PCR (intensité de la bande sur gel d'agarose 1%) et enfin centrifugation 1 minute à 13000 rpm (18000 g). Un milieu de réaction contenant 1 volume de PCR purifié, 0,3 µM d'amorce sens ou antisens et 2 volumes d'eau est alors préparé et envoyé à la plateforme de séquençage de l'Institut Cochin où le séquençage est effectué avec le kit Big Dye terminator v1.1 (Applied Biosystems®).

Les fragments amplifiés au centre de génétique de la Pitié-salpêtrière sont quant à eux purifiés par le mélange exonucléase I et phosphatase alcaline (Biolabs ozyme®) incubé à 37°C pendant 15 min, puis inactivé à 80°C pendant 15min. Le programme comprend un maintien à 4°C continu (∞). La réaction de séquence est ensuite effectuée sur un mélange réactionnel contenant le tampon à 1X, 0.5µl de Big Dye Terminator et de l'eau qsp 9,5µL (kit ABI, Applied Biosystems®). 0.5 µl d'amorces sens et antisens universelles (queues M13) à 10 µM sont ensuite ajoutées ainsi que 1.5 µl de produit amplifié. Les programmes de séquençage sont répertoriés dans le tableau 21. Les réactions de séquence sont purifiées à l'aide du kit Agencourt CleanSEQ dye terminator removal (Figure 81).

Pour tous les gènes séquencés, le séquençage est effectué par électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique 48 capillaires Abi Prism 3730xl® (Applied Biosystems). Les résultats sont analysés avec le logiciel SeqScape®.



Figure 82 : OROBOROS Oxygraph-2k

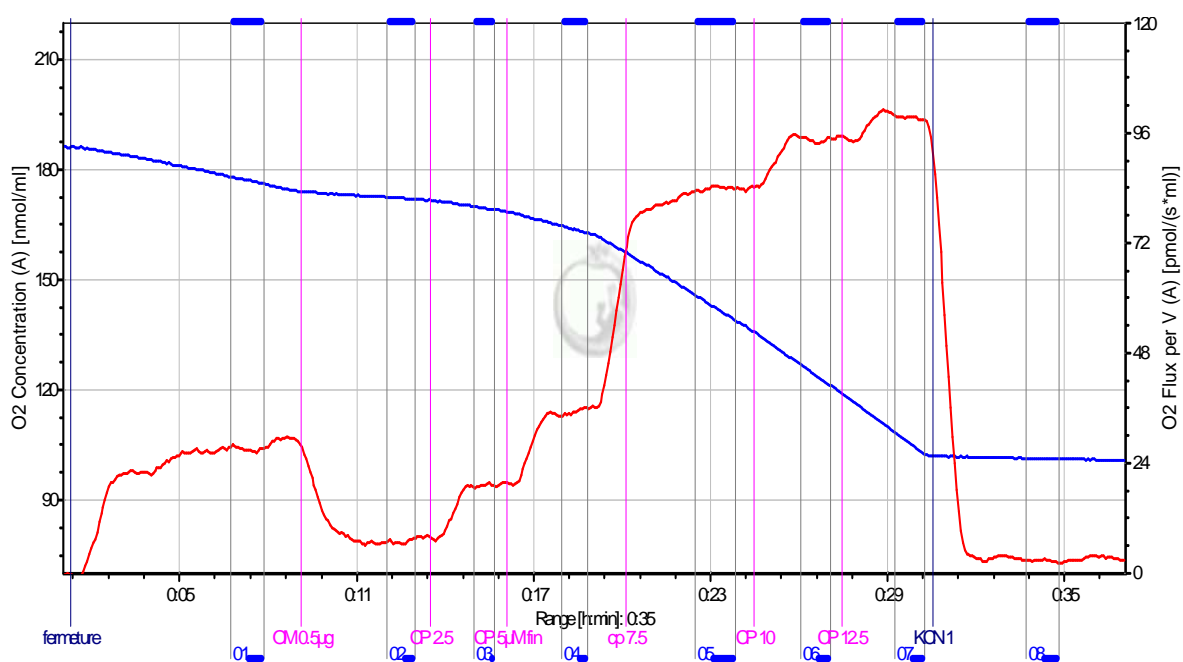


Figure 83 : Exemple de courbe obtenue avec le protocole de polarographie
 OM : oligomycine ; CP : carbonyl cyanide chlorophenylhydrazone (cccip) ;
 KCN : cyanure de potassium

Courbe bleue : concentration en oxygène dans la chambre

Courbe rouge : courbe dérivée correspondant à la respiration cellulaire

5. Etude cellulaire

a) Méthodes polarographiques : mesure de la respiration cellulaire

La polarographie est la mesure de la consommation d'oxygène. Elle utilise une électrode à oxygène de type électrode de Clark. Il en existe différents modèles. Nous avons surtout utilisé l'appareil Oroboros® qui permet de mesurer la concentration en oxygène dans une chambre grâce à une microélectrode d'or (Figure 82).

Les cellules sont analysées à une concentration proche de 1 million de cellules par mL dans leur milieu de culture. La respiration basale est d'abord mesurée.

L'ajout de 1 μM d'oligomycine permet ensuite de mesurer le couplage de la respiration à la phosphorylation. En effet l'oligomycine est un inhibiteur puissant de l'ATP synthase qui donc annule l'utilisation du gradient de protons pour la phosphorylation de l'ADP en ATP ce qui ralentit fortement la respiration (état 4).

Des faibles doses d'agents découplants sont ensuite injectées dans la chambre pour induire la dissipation progressive du potentiel de membrane et donc l'accélération de la respiration. Le niveau maximal de respiration reflète les réserves respiratoires fonctionnelles. Il existe différentes molécules découplantes. Nous avons utilisé le protonophore carbonyle cyanide m chlorophenylhydrazone (cccp), qui a été ajouté par paliers de 2,5 μM .

Enfin l'ajout de 1 mM de KCN permet d'inhiber complètement la consommation d'oxygène par la cytochrome *c* oxydase et donc de mesurer la consommation non respiratoire d'oxygène (Figure 83).

Les données sont enregistrées et analysées grâce au logiciel Datlab 4.

b) Technique du rouge neutre

Le rouge neutre s'accumule dans les lysosomes des cellules. Après solubilisation du colorant, la mesure spectrophotométrique du rouge est proportionnelle au nombre de cellules. Les conditions de culture peuvent modifier le nombre des lysosomes (par exemple la culture en présence de 4.5 g/L de glucose est associée à une prolifération des lysosomes). Il est donc important de faire les mesures dans des milieux équivalents. Cette méthode est utilisée dans les protocoles de mesure de prolifération ou de survie cellulaire.

Les cellules sontensemencées dans des plaques de 12 ou 24 puits. Pour leur numération, les cellules sont incubées en présence de 33 $\mu\text{g/mL}$ de rouge neutre dans le milieu de culture choisi durant 4 heures à 37°C sous 5 % de CO_2 . Chaque puits est rincé deux

fois pendant 5 minutes dans l'incubateur avec 2 mL de PBS tiédi. Le PBS est ensuite aspiré et la plaque conservée à 4°C jusqu'au jour du dosage spectrophotométrique.

Le jour du dosage, le rouge neutre est solubilisé par l'ajout d'une solution 50% Ethanol, 1% acide acétique (1 mL par puits de plaque de 12 puits, 0,5 mL si plaque de 24 puits) en prenant soin de bien mélanger par rotation douce.

La lecture se fait sur lecteur de plaques (Fluostar) par mesure soit de l'absorbance à la longueur d'onde 540 nm, soit de la fluorescence (excitation 544nm, émission 600nm). Une plaque contenant seulement la solution éthanol/ac acétique sert à l'évaluation du blanc.

(1) Application à la mesure du temps de doublement cellulaire

Le temps de doublement des fibroblastes cutanés en culture peut être calculé par la méthode du rouge neutre en suivant l'augmentation de la coloration au cours du temps dans des puits parallèles. Cette méthode a été utilisée pour tester des conditions énergétiques telles que la culture en présence de 1 g/L de glucose ou de 1 g/L de galactose à la place du glucose. Cette deuxième condition est énergétiquement moins favorable et demande donc aux cellules une plus grande contribution de la chaîne respiratoire.

(a) Ensemencement des cellules

Deux lignées cellulaires sont étudiées en parallèle. Pour chacune d'elles, on ensemence 3000 cellules par puits dans du milieu de culture complet contenant 1 g/L de glucose selon le schéma suivant pour deux lignées cellulaires A et B. Les plaques sont marquées T0, T24h, T48h et T72h, T0 correspondant au lendemain de l'ensemencement.

Cellules A	Cellules A	Cellules B	Cellules B
Cellules A	Cellules A	Cellules B	Cellules B
Cellules A	Cellules A	Cellules B	Cellules B

(b) Marquage des cellules

A T0, un changement du milieu de culture est réalisé avec du milieu contenant 1 g/L de glucose dans les colonnes 1 et 3 et avec du milieu contenant 1 g/L de galactose dans les colonnes 2 et 4. La plaque T0 est alors colorée par la méthode du rouge neutre (cf ci-dessus).

A T24h, T48h et T72h, la plaque correspondant au temps est traitée comme la plaque T0.

(c) Mesure du temps de doublement

Le calcul du temps de doublement repose sur le rapport de la densité cellulaire initiale sur la différence de densité obtenue en un jour $[DO_n/(DO_{n+1}-DO_n)]$, les densités cellulaires étant reflétées par la quantité de rouge neutre.

(2) Application aux tests de survie cellulaire après stress

Dans cette expérience on utilise aussi la méthode du rouge neutre pour dénombrer les cellules ayant résisté à différents traitements. L'utilisation de plaques de 24 puits permet de tester assez facilement de nombreuses conditions différentes.

Chaque population cellulaire d'intérêt estensemencée dans les 24 puits d'une plaque de façon à être à confluence 48 heures plus tard. Les incubations dans les différentes conditions sont débutées de façon étagée afin de toutes s'achever en même temps. Nous avons réalisé deux types de stress cellulaire.

(a) Stress « métabolique »

GLU 5mM	GLU 5mM	GLU 5mM	OM 1µg/mL	OM 1µg/mL	OM 1µg/mL
GLU 25mM	GLU 25mM	GLU 25mM	tBH 100µM	tBH 100µM	tBH 100µM
GAL 5mM	GAL 5mM	GAL 5mM	tBH 200µM	tBH 200µM	tBH 200µM
DG 10mM	DG 10mM	DG 10mM	tBH 400µM	tBH 400µM	tBH 400µM

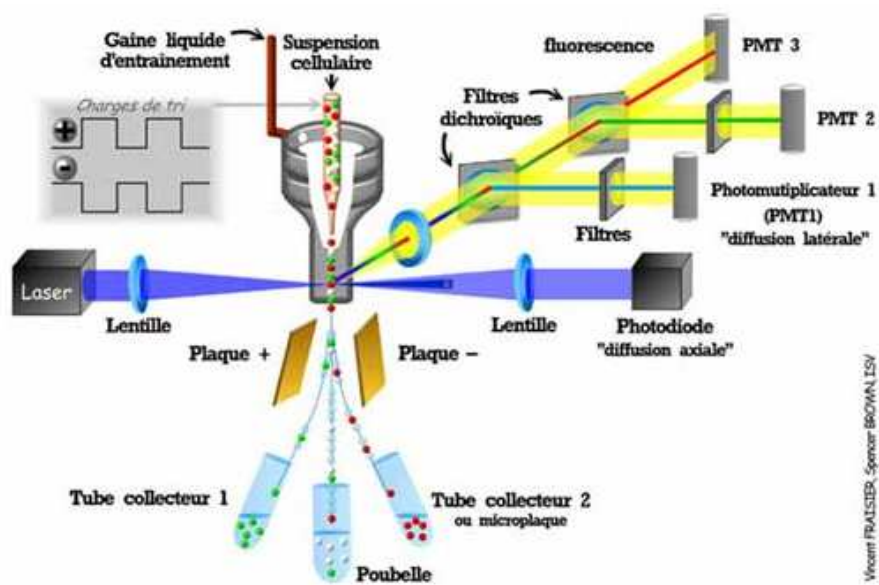
GLU= glucose, GAL = galactose (incubation 72 heures), DG= déoxyglucose, OM = oligomycine (incubation 16 heures), tBH= tert butyl hydroperoxyde (incubation 4 heures).

(b) Stress pro-apoptotique

GLU 5mM	GLU 5mM	GLU 5mM	ETO 100µM	ETO 100µM	ETO 100µM
STAU 1µM	STAU 1µM	STAU 1µM	ETO 200µM	ETO 200µM	ETO 200µM
STAU 2µM	STAU 2µM	STAU 2µM	ETO 400µM	ETO 400µM	ETO 400µM
STAU 4µM	STAU 4µM	STAU 4µM	GLU 5mM	GLU 5mM	GLU 5mM

GLU= glucose (incubation 72 heures), STAU = staurosporine, ETO = etoposide (incubation 4 heures).

La staurosporine est un inhibiteur de la protéine kinase C. L'étoposide est un inhibiteur de la topoisomérase II et qui forme un complexe ternaire avec l'ADN.



Vincent FRAUSTIER, Spencer BROWN, ISV

Figure 84 : Représentation schématique d'un cytomètre en flux
<http://www.ifr87.cnrs-gif.fr/pbc/images/photos/cytometre.jpg>

c) Cytométrie en flux

Les différentes analyses ont été effectuées sur l'appareil Accuri C6 flow cytometer BD Biosciences.

(1) *Principe*

Le principe de la cytométrie en flux est d'effectuer une analyse multiparamétrique de cellules individualisées (figure 84). Les cellules doivent être dissociées les unes des autres et utilisées sous forme d'une suspension. Une fois l'échantillon préparé, les cellules doivent défiler les unes derrière les autres pour être analysées individuellement. Cela est possible grâce à un principe de mécanique de fluides appelé hydrofocalisation. La solution contenant la suspension cellulaire est amené par le biais d'un injecteur, au centre d'une buse dans laquelle un liquide dit « de gaine » est poussé avec une vitesse plus ou moins élevée dont va dépendre la vitesse de défilement des cellules. En effet, la sortie de la buse est un orifice réduit et parfaitement calibré. Cette sortie réduite va provoquer une accélération du liquide et la formation d'un jet, d'une gaine liquide, d'un diamètre équivalent à celui de l'orifice de sortie. Par ailleurs l'architecture de la buse est conçue pour obtenir un flux laminaire au centre duquel les cellules vont être transportées. L'accélération induit un défilement rapide et régulier des cellules qui, ainsi séparées les unes des autres peuvent faire l'objet d'une analyse individuelle.

En aval de la focalisation hydrodynamique, l'analyse des cellules est rendue possible par le biais d'une source d'excitation lumineuse qui vient frapper les cellules induisant ainsi l'émission de fluorescence des fluorochromes utilisés pour le marquage. Les premiers appareils étaient équipés d'un faisceau à arc mais aujourd'hui la source lumineuse utilisée est principalement le faisceau laser qui présente l'avantage d'être monochromatique et d'être plus facile à diriger et à focaliser. Un jeu de prismes et de lentilles permet de positionner avec précision le point d'intersection entre le laser et le flux.

Lorsque les cellules circulant dans la veine liquide sont frappées par le faisceau laser, elles émettent des signaux lumineux qui sont collectés par un système optique pour être amenés jusqu'aux photodétecteurs.

De l'interaction entre le faisceau et les particules, résultent des signaux lumineux de plusieurs natures :

- La diffusion aux petits angles (forward scatter), collectée dans l'axe du faisceau laser et correspondant d'un point de vue physique à la diffraction, donne une indication sur la taille des particules à analyser,
- La diffusion aux grands angles (side scatter), collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux, est un mélange de diffusion, de réflexion et de réfraction et donne des indications sur la structure interne des cellules,
- La fluorescence est collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux.

Les signaux sont collectés et dirigés vers les détecteurs grâce au banc optique. Il est équipé d'une lentille de collection, de miroirs dichroïques et de filtres (passe-haut, passe-bas ou passe-bande) qui permettent de diriger les longueurs d'onde de la lumière collectée vers les détecteurs appropriés. Le signal lumineux, c'est-à-dire les photons résultant du passage des cellules devant le laser, est ensuite transformé en un signal électrique par des photodiodes et des photomultiplicateurs qui pourra être digitalisé puis enregistré et traité par un ordinateur {Gilleron, 2009}.

(2) Analyse de la production d'espèces réactives de l'oxygène

Pour l'étude du stress oxydant, nous avons choisi d'utiliser le marqueur fluorescent MitoSox®. Ce marqueur peut pénétrer à l'intérieur de cellules vivantes et une fois rentré, il va s'accumuler directement dans la mitochondrie. Une fois dans la mitochondrie, il va être oxydé par les anions superoxyde et émettre une fluorescence rouge.

Pour chaque lignée cellulaire analysée sont préparées les solutions suivantes :

- 0,5 mL de milieu de culture à 10^6 cellules/mL
- Solutions stock : oligomycine (1 mg/mL ou 1 mM) et antimycine 2,5 mg/mL
- Solution de MitoSox à 5 mM

Différents milieux d'incubation (0,5 mL x nombre de lignées cellulaires étudiées) sont ensuite préparés et mis à chauffer à 37°C :

- milieu de culture normal (1 g/L de glucose) = base
- milieu de culture normal + 1 µg/mL oligomycine = oligomycine (OM)
- milieu de culture normal + 2,5 µg/mL antimycine = antimycine (AM).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'oligomycine est un inhibiteur puissant de l'ATP synthase qui donc annule l'utilisation du gradient de protons pour la phosphorylation de l'ADP en ATP ce qui ralentit fortement la respiration et l'antimycine est un inhibiteur du complexe III se fixant au niveau du site Qi.

Une seule lignée cellulaire est étudiée à la fois pour limiter le temps d'incubation total par lignée.

Les cellules de la première lignée diluées à 1 000 000 cellules/mL sont chargées avec du MitoSox 5 μ M (soit 0,5 μ L pour 500 μ L de cellules) par incubation 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite diluées à environ 100 000 cellules par mL en ajoutant 50 μ L de cellules à 10^6 cell/mL dans 450 μ L de chacun des milieux de culture (base, OM et AM). Pour la lecture : sont transférés 100 μ L de chaque incubation dans les puits d'une plaque de 96 puits à fonds plats (on a 3 puits pour les 3 incubations de chaque lignée cellulaire). Les temps de début et de fin de lecture sont notés de façon à pouvoir évaluer la cinétique d'apparition des anions superoxydes. Quatre lectures d'environ 3 à 4 minutes sont réalisées.

(3) Analyse du potentiel membranaire

Les cellules perméabilisées avec de la digitonine sont incubées dans des solutions présentant différentes conditions bioénergétiques en présence de rhodamine 123. Celle-ci est un colorant cationique vert fluorescent perméant dans les cellules vivantes et qui est facilement séquestré par les mitochondries actives sans effets cytotoxiques. L'entrée du produit dans la mitochondrie est dépendante du potentiel de membrane.

(a) Préparation des différentes conditions bioénergétiques

Solutions glutamate+ malate

- 1) Solution GMA = glutamate 10 mM + malate 10 mM :** 20 mL de tampon de respiration (100 mM KCl, 40 mM sucrose, 10 mM TES, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH 7,2 avec en plus 10 mM de K Phosphate) sont préparés puis sont ajoutés, 10 mM glutamate, 10 mM malate. 2 mL sont mis de côté pour servir pour l'analyse de la condition GMA. Le reste est utilisé pour la suite.
- 2) Solution GMB = glutamate 10 mM + ADP 2,5 mM :** au reste de la solution GMA est ajouté de l'ADP à 2.5 mM.

- 3) **Solution GMC = glutamate 10 mM + ADP 2,5 mM + OM 1 μ M** : au reste de la solution GMB est ajouté de l'oligomycine 2 μ M.
- 4) **Solution GMD = glutamate 10 mM + ADP 2,5 mM + OM 1 μ M + CP 2 μ M** : au reste de la solution GMC est ajouté du cccp 2 μ M.
- 5) **Solution GME = glutamate 10 mM + ADP 2,5 mM + OM 1 μ M + CP 4 μ M** : au reste de la solution GMD est ajouté du cccp 2 μ M.
- 6) **Solution GMF = glutamate 10 mM + ADP 2,5 mM + OM 1 μ M + CP 8 μ M** : au reste de la solution GME est ajouté du cccp 4 μ M.
- 7) **Solution GMG = glutamate 10 mM + ADP 2,5 mM + OM 1 μ M + CP 16 μ M** : au reste de la solution GMF est ajouté du cccp 8 μ M.
- 7) **Solution GMH = glutamate 10 mM + ADP 2,5 mM + OM 1 μ M + CP 16 μ M + antimycine 2,5 μ g/mL** : Au reste de la solution GMG est ajouté de l'antimycine 2,5 μ g/mL.

Solutions succinate

- 1) **Solution SA = succinate 20 mM** : 20 mL de tampon de respiration avec Pi sont préparés puis sont ajoutés et 20 mM de succinate. 2 mL sont mis de côté pour l'analyse comme pour chaque solution préparée ci-dessous.
- 2) **Solution SRA = succinate 20 mM + roténone 10 μ M** : au reste de la solution SA est ajouté 10 μ M de roténone.
- 3) **Solution SRB = succinate 20 mM + roténone 10 μ M + ADP 2,5 mM** : au reste de la solution SRA est ajouté de l'ADP à 2.5 mM.
- 4) **Solution SRC = succinate 20 mM + roténone 10 μ M + ADP 2,5 mM + OM 1 μ M** : au reste de la solution SRB est ajoutée de l'oligomycine 1 μ M.
- 5) **Solution SRD = succinate 20 mM + roténone 10 μ M + ADP 2,5 mM + OM 1 μ M + CP 2 μ M** : au reste de la solution SRC est ajouté du cccp à 2 μ M.
- 6) **Solution SRE = succinate 20 mM + roténone 10 μ M + ADP 2,5 mM + OM 1 μ M + CP 4 μ M** : au reste de la solution SRD est ajouté du cccp à 2 μ M.

7) Solution SRF = succinate 20 mM + roténone 10 μ M + ADP 2,5 mM + OM 1 μ M + CP 8 μ M : au reste de la solution SRE est ajouté du cccp à 4 μ M.

8) Solution SRG = succinate 20 mM + roténone 10 μ M + ADP 2,5 mM + OM 1 μ M + CP 16 μ M : au reste de la solution SRF est ajouté du cccp à 8 μ M.

Ces solutions sont ensuite déposées à raison de 40 μ l par puits sur une plaque de 96 puits.

(b) Perméabilisation des cellules

A 500 μ L de cellules préparées à 1 000 000 cellules/mL dans le tampon de respiration sans BSA est ajoutée de la digitonine à raison de 20 μ g/million de cellules. Le tout est ensuite incubé 5 minutes dans la glace. La BSA fatty acid free est ajoutée à 4 mg/mL puis le tout est dilué au 1/4 dans du tampon de respiration et mis en présence de rhodamine 400 nM.

Enfin 40 μ l de suspension cellulaire sont ajoutés par puits et cet ajout est suivi d'une incubation de 5 minutes avant lecture.

Le potentiel est alors calculé par l'équation de Nernst en considérant la fluorescence en condition G comme zéro (fluoZéro) et 1% comme volume mitochondrial dans l'espace lu par le cytomètre.

$$\text{Potentiel A} = 59 * \text{Log}[(\text{fluoCondA} - (0.99 * \text{fluoZéro})) / (0,01 * \text{fluoZéro})].$$

(4) Analyse de l'apoptose

Dans une cellule non-apoptotique, les phosphatidylsérines membranaires ne sont situées que sur la face interne de la membrane. Dès qu'une cellule entre en apoptose, elles sont délocalisées et exposées à la face externe {Fadok, 1992}. L'annexine ayant une forte affinité pour ces phosphatidylsérines va marquer les cellules apoptotiques. Les cellules mortes seront aussi marquées par l'annexine, c'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser un double marquage en rajoutant de l'Iodure de Propidium (IP) lors du marquage qui ne pénétrera que dans les cellules mortes. Les cellules apoptotiques mais ayant une membrane intacte seront Annexine+IP- et les cellules mortes Annexine+IP+.

Pour notre étude, nous avons choisi d'utiliser le kit « Annexin V-EGFP apoptosis detection Kit » de Biovision®. Dans ce kit l'annexine est couplée à l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein).

Les cellules d'un T75 sont récoltées et diluées à 50 000 cellules par mL dans un tampon maison (100mM KMES, 1 mM EGTA, 3 mM EGTA, 5 mM K Phosphate pH 7,4, 5 mM glucose et 4 mg/mL BSA).

Elles sont réparties dans 3 tubes Eppendorf contenant chacun la suspension cellulaire :

- Conditions de base : cellules dans le tampon respiratoire.
- Conditions pro-apoptotiques induites par deux agents pharmacologiques, jouant sur des cibles cellulaires différentes :
 - 1 μ M staurosporine,
 - 400 μ M d'étoposide.

Les cellules sont incubées durant 3 heures à 37°C dans un bloc chauffant, récoltées par centrifugation à 2655 g (5000 rpm) pendant 5 minutes, reprises dans 500 μ L de tampon de fixation avec 5 μ L d'annexin V couplée à l'EGFP et 5 μ L d'iodure de propidium et enfin incubées durant 5 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Pour l'analyse, le signal de l'annexin V-EGFP (excitation 488 nm et d'émission 530 nm) est détecté dans le canal FL1, celui de l'iodure de propidium (excitation 488 nm, émission 585 nm) est détecté dans le canal FL3. Les résultats sont analysés avec le logiciel BD CSampler™ Analysis Software BD Biosciences.

6. Analyses statistiques

Les données obtenues pour les fibroblastes « patients » et « contrôles » étant des observations faites sur des séries indépendantes de taille inférieure à 30 et d'un caractère dont on ignore s'il est gaussien, le test le plus couramment utilisé est le test non paramétrique de comparaison de moyenne de Mann et Whitney. Le seuil de significativité choisi est $p < 0.05$.

Dans le cas d'expériences réalisées une seule fois, les résultats ont été évalués par rapport au 5^{ème} et 95^{ème} centile des contrôles.

B. Etude de la répartition tissulaire

Cette étude a été effectuée sur mitochondries de muscle, foie et cerveau murins disponibles au laboratoire. Les conditions de migration électrophorétique en conditions dénaturantes décrites dans le paragraphe B.1.b.(3).(b).(i) ont été appliquées.

Les quantités de protéines déposées sont variables et vont de 5 μ g à 100 μ g.

Exon	Conditions de PCR	Amorces	Séquences 5'→3'	Taille oligo-nucléotides pb	Taille Fragment
2	TD 70-60	2AF	CTCCACGTCTTCCAGCCAGTAAAA	24	414
		2AR	TTCTGCAGGTGCTCGACGCT	20	
		2ABF	CCTGCTCTGGAGGAAGGTG	19	400
		2ABR	GTCCAGGTTGTCCCCGTAG	19	
		2BF	GGGCTGCACGAGCAAATCTT	38	579
		2BR	TTCAACACATCAGCGCTCC	37	
3	TD 65-55	3F	CCTGACCTGTAGCTGTTTGA	38	490
		3R	GACACGTGCCAGGAAAG	35	
4	TD 65-55	4F	GAGGTCCACACCACCAA	35	386
		4R	AAGGGACATGGCAGATCA	36	
5	TD 65-55	5F	GCAGGAGCATAGTGCTTGG	19	296
		5R	CAAGTGCAGCTAGGGGTGTG	20	
6	TD 65-55	6F	CCTGACCCTGAGAGCTGGT	19	239
		6R	AGATAGAACCAGCGCCACCT	20	
7	TD 65-55	7F	TTTGAGCTGTGCCATGT	35	410
		7R	GGCTAAGGCTAAGCCGAA	36	
8	TD 65-55	8F	TTGGGTGGGCAGGATCT	35	378
		8R	CAGAAGGCTGGAGCAATCC	38	
9	TD 65-55	9F	GGGTGGGAGCAGATCTTATTG	21	249
		9R	TGAGAAATGGAGCAAGGGTAGA	21	
10	TD 65-55	10F	GGACATTGTGAGAGAGAGAAC	39	456
		10R	CCCAGACTCTTGAACCCAAA	38	
11-12	TD 65-55	11-12F	GGGAATTGTGGAAGGCACTA	20	584
		11-12R	TGGCTGGGAAGAAGTAGGTG	20	
13	TD 65-55	13F	GTCATTTCCAGCTGATGAC	38	388
		13R	TCACACTCTGTCCCACTACT	38	
14	TD 65-55	14F	GTTCTGGGCTCAGTGTT	35	413
		14R	CAGGCCTCTAGACCATAGT	37	
15-16	TD 65-55	15-16F	GTAATGGAGTATAGCAGTCC	20	457
		15-16R	CTCAGAGCCCAGTTTCTAC	19	
17	TD 65-55	17F	GTGGCCATCTCTGGAAC	35	356
		17R	CTGGGCTGCCCCAAC	33	
18	TD 65-55	18F	GAATGTTCTCTGAGTGCTTT	38	418
		18R	TGGGCAGGAGATAGAACAGA	38	
19	TD 65-55	19F	TGGCATGATGTCAGTGTTTT	21	300
		19R	CAAGCTCTTCTGGGGCAAG	19	
20	TD 65-55	20F	AGGGGAGGGGTCTGGGCTT	19	361
		20R	GCCCTACCTACAAACATTGG	19	
21	TD 65-55	21F	AGCTCCCTGTGGACCTTA	36	464
		21R	AGTCAAACTGACCAGTCT	37	
22	TD 65-55	22F	TCATTGCTCCAGGAGTGAT	37	414
		22R	GCACCTTATAAACTGAAATTAGCC	42	
23	TD 65-55	23F	CTTCACTCTCCTTTTGACC	20	303
		23R*	TGAAAAATGGCTGGCCTTAG	20	
		23F*	CTTGAGGTGGCATCCTAACC (primer interne)	20	151
		23Rbis*	CTCCACGGGAGCAAATACAG (primer interne)	20	
Queue		M13F	TGTA AACGACGGCCAGT	18	
		M13R	CAGGAAACAGCTATGACC	18	

Tableau 22: amorces et conditions de PCR du gène *POLG*
TD : Touch-Down ; F : Forward ; R : Reverse ; pb : paires de bases
Les amorces sont additionnées des queues M13

L'anticorps primaire utilisé est l'anticorps Mitoprofile (Invitrogen) à la dilution de 1/250^{ème}. Celui-ci est dirigé contre une sous-unité de chacun des cinq complexes de la chaîne des OXPHOS :

- Sous-unité alpha du complexe V (53kDa)
- Sous-unité core 2 du complexe III (47kDa)
- Sous-unité SDHB du complexe II (30 Kda)
- Sous-unité cox2 du complexe IV (24 kDa)
- Sous-unité NDUFB8 du complexe I (20kDa).

L'anticorps secondaire est un anticorps simien anti-lapin (Jackson ImmunoResearch®) toujours utilisé à la dilution 1/5000^{ème}. La révélation se fait avec le réactif ECL Pico (Super Signal West Pico, Thermoscientific®).

C. Etude des mutations de la polymérase γ

1. Matériel

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe V.B.1, notre étude rétrospective a porté sur 154 patients ayant bénéficié d'un séquençage complet du gène *POLG* au centre de génétique de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière de 2005 à 2012. Les données cliniques, électromyographiques, d'imagerie, anatomopathologiques et biologiques ont été analysées en collaboration avec le Dr Maya Tchikviladzé, praticien en neurologie à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière.

2. Méthodes

a) Séquençage du gène *POLG* (NM-002693.2)

Le séquençage du gène *POLG* a été effectué au centre de génétique de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière.

Les différentes amorces sont listées dans le tableau 22.

Le mélange de PCR réactionnel est le suivant (TD65-55/TD70-60) :

- Eau qsp 18/15.5 μ l
- Tampon 10X 2.5 μ l
- dNTP 1mM 5/2.5 μ l
- AmpliTaq Gold PCR (Applied Biosystem®) 0.15 μ l
- GC-Rich 0/2.5 μ l
- ADN (10 ng/ μ l) 1.5 μ l

PROGRAMME PCR 70-60°C				
Dénaturation		95°C	5 min	
1ère étape	Dénaturation	95°C	30 sec	10 cycles
	Hybridation	70°C-1°C par cycle	30 sec	
	Elongation	72°C	30 sec	
2ème étape	Dénaturation	95°C	30 sec	35 cycles
	Hybridation	60°C	30 sec	
	Elongation	72°C	30 sec	
Elongation finale		72°C	10 min	

PROGRAMME PCR 65-55°C				
Dénaturation		95°C	5 min	
1ère étape	Dénaturation	95°C	30 sec	10 cycles
	Hybridation	65°C – 1°C par cycle	30 sec	
	Elongation	72°C	30 sec	
2ème étape	Dénaturation	95°C	30 sec	35 cycles
	Hybridation	55°C	30 sec	
	Elongation	72°C	30 sec	
Elongation finale		72°C	10 min	

Tableaux 23 et 24 : Programmes d'amplification du gène *POLG*

	Programme	
Dénaturation		96°C 1 min
25 cycles	Dénaturation	96°C 10 sec
	Hybridation	55°C 15 sec
	Elongation	60°C 4 min
Refroidissement		10°C ∞

Tableaux 25 : Programme de séquençage du gène *POLG*

Les conditions d'amplification sont détaillées dans les tableaux 23 et 24.

La réaction de séquence est ensuite effectuée sur un mélange réactionnel contenant le tampon à 5X, 0.5µl de Big Dye Terminator et de l'eau qsp 12,5µL (kit ABI, Applied Biosystems®). 1 µl d'amorces sens et antisens universelles (queues M13) à 10 µM sont ensuite ajoutées ainsi que 2 µl de produit amplifié. Le programme de séquençage est indiqué dans le tableau 25. Les méthodes de purification sont les mêmes (mélange exonucléase et phosphatase alcaline) que celles utilisées pour le séquençage des sous-unités du complexe III de la chaîne respiratoire. De même, le séquençage est effectué par électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique 48 capillaires Abi Prism 3730xl (Applied Biosystems). Les résultats sont analysés avec le logiciel SeqScape.

b) Dosage du lactate sanguin ou céphalo-rachidien

La méthode utilisée pour le dosage du lactate est une réaction enzymatique pour convertir le lactate en pyruvate. Le peroxyde d'hydrogène produit au cours de cette réaction est ensuite utilisé dans une réaction enzymatique pour générer un dérivé coloré. Ces réactions sont schématisées ci-dessous :

$\text{Lactate} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Pyruvate} + \text{H}_2\text{O}_2$ sous l'action de la lactate deshydrogénase

$\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-chlorophénol} + \text{amino-4-antipyrine} \rightarrow \text{quinonéimine} + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{HCl}$.

Le dosage du lactate est réalisé soit sur l'automate Konélab 30i de la société Thermo Electron Corporation à l'aide du coffret de dosage de chez Roche Diagnostics (ref. 11822837) soit sur l'automate Modular Analytics (Roche diagnostics) dans quelques cas au service de Biochimie Métabolique de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière.

Le prélèvement sanguin se fait sur tube de 5 ml contenant du fluorure d'oxalate additionné d'iodoacétate de sodium. Il est mis dans la glace afin d'inhiber in vitro la production de lactate par les cellules sanguines. Le sang total est ensuite mélangé avec de l'acide perchlorique 1N volume à volume dans un tube plastique de 10 mL ; le tout est vortexé, laissé au repos 5 minutes pour que la déprotéinisation soit totale et centrifugé à 3500 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant va alors être transvasé dans un tube à hémolyse et recentrifugé à 3500 tours /minute pendant 10 minutes. Le lactate est alors dosé sur ce surnageant.

Le liquide céphalo-rachidien est recueilli sur un tube transparent de 3 mL sans anticoagulant. Il est traité par la suite de la même façon que le prélèvement sanguin.

Fragment	Amorces
15 kb	CGCCCACTAAGCCAATCACT/ CGCCAAGGAGTGAGCCGAAG
13 kb	CCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGATG/GTCAAG TATTATGGTACCGTACAA

Tableau 26 : Amorces utilisées pour la PCR Long Range

Fragment	Position	Dénaturation	10 Cycles (1)Dénaturation (2)Hybridation (3)Elongation	20 Cycles (1)Dénaturation (2)Hybridation (3)Elongation
15kb	3214F- 16146R	93°C / 1 min30	93°C, 20 sec 57°C, 30 sec 68°C, 15 min	93°C, 20 sec 57°C, 30 sec 68°C, 15 min*
13 kb	15698F- 14861R	93°C / 1 min30	93°C, 20 sec 54°C, 30 sec 68°C, 13 min	93°C, 20 sec 54°C, 30 sec 68°C, 13 min*

Tableau 27 : Programmes PCR Long range

* Incrémentation de 10 secondes par cycle

c) PCR “Long Range” (ADN mitochondrial)

Dans une PCR classique, il est difficile d’amplifier des fragments dont la longueur dépasse 2 à 3 kb. L’optimisation des conditions expérimentales et l’utilisation d’une Taq polymérase avec activité exonucléase (ExTaq polymérase®) permettent l’amplification de fragments allant jusqu’à 40 kb. L’incubation doit être effectuée à un pH plus élevé que dans une PCR normale et il faut diminuer le temps de l’étape de dénaturation et augmenter celui de l’étape d’élongation {Kaplan, 2007}.

Deux amplifications de 13 et 15 kb sont réalisées en parallèle dans le cadre du diagnostic à la Pitié-salpêtrière ce qui permet de couvrir intégralement l’ADN mitochondrial. La longueur des fragments à amplifier implique un temps d’élongation augmenté (13 ou 15 minutes par cycle), des dNTPs en concentration suffisante et une Taq polymérase adaptée, la Ex Taq polymérase (TAKARA). Il s’agit d’une ADN polymérase thermostable, qui possède une activité 3' à 5' exonucléase. Cette activité permet d’exciser les bases mal incorporées et permet la progression de la réaction sans à-coup. Par conséquent, l’amplification de longs fragments d’ADN peut être effectuée.

Le mélange réactionnel est le suivant :

- Amorces 10 pM (tableau 26)
- dNTP 2 mM
- Tampon Takara 1X
- MgCl₂ 25mM
- ExTaq 0.02 U/μl
- Eau qsp 50μl

A ce mix est ajouté 1μl d’ADN à 50 ng/μl.

Les programmes d’amplification sont présentés dans le tableau 27.

Les produits de PCR migrent ensuite sur un gel d’agarose à 0.7% toute une nuit à 30 volts.

Cette PCR a été utilisée pour la recherche de délétions multiples de l’ADN mitochondrial musculaire. Quand une seule bande supplémentaire était retrouvée, la présence d’une délétion unique était confirmée par Southern Blot.

d) Analyse histochimique des biopsies musculaires

Les biopsies musculaires ont été immédiatement congelées à -80°C après leur prélèvement. Des coupes sont soumises à différentes colorations et réactions histochimiques ou histoenzymatiques au laboratoire d'anatomopathologie de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière : trichrome de Gomori, histo enzymologie de l'activité succinate déshydrogénase, de l'activité Cytochrome *c* oxydase et coloration OilRed O.

e) Mesures spectrophotométriques des activités résiduelles des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sur tissus ou fibroblastes

Les mesures des activités résiduelles des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ont été effectuées comme cité dans le paragraphe A.

3. Analyses statistiques

Les proportions ont été comparées avec le test de chi² ou, lorsqu'un des nombres était de valeur inférieure à 5, le test exact de Fisher, et en utilisant la correction de Yates. Les moyennes ont été comparées avec le test non paramétrique de Mann et Whitney, ou avec un test *t* si les populations avaient une distribution normale. Pour les comparaisons multiples, la méthode de correction de Bonferroni a été appliquée.

VIII. Bibliographie

- Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 2008;32:529-39.
- Agier V. Physiopathologie des mutations hétérozygotes du gène OPA1. Etude dans les fibroblastes primaires en culture. Paris: UPMC, Paris 6; 2010.
- Agier V, Oliviero P, Laine J, et al. Defective mitochondrial fusion, altered respiratory function, and distorted cristae structure in skin fibroblasts with heterozygous OPA1 mutations. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:1570-80.
- Al-Owain M, Colak D, Albakheet A, et al. Clinical and biochemical features associated with BCS1L mutation. *J Inherit Metab Dis* 2013;36:813-20.
- Alpers BJ. Progressive cerebral degeneration of infancy. *J Nerv Ment Dis* 1960;130:442-8.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457-65.
- Andersson SG, Karlberg O, Canback B, Kurland CG. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358:165-77; discussion 77-9.
- Andreu AL, Bruno C, Dunne TC, et al. A nonsense mutation (G15059A) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria. *Ann Neurol* 1999;45:127-30.
- Andreu AL, Bruno C, Shanske S, et al. Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology* 1998;51:1444-7.
- Andreu AL, Checcarelli N, Iwata S, Shanske S, DiMauro S. A missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene in a revisited case with histiocytoid cardiomyopathy. *Pediatr Res* 2000;48:311-4.
- Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, et al. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 1999;341:1037-44.
- Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, et al. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 1999;341:1037-44.

- Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, et al. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 1999;341:1037-44.
- Antonicka H, Sasarman F, Kennaway NG, Shoubridge EA. The molecular basis for tissue specificity of the oxidative phosphorylation deficiencies in patients with mutations in the mitochondrial translation factor EFG1. *Hum Mol Genet* 2006;15:1835-46.
- Attardi G CP, Chomyn A, et al. A comprehensive view of mitochondrial gene expression in human cells. Cold Spring Harbor, NY 1982:51-71.
- Atwal PS, Brennan ML, Cox R, et al. Clinical whole-exome sequencing: are we there yet? *Genet Med* 2014.
- Aubourg p. Thérapeutique des maladies mitochondriales. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie* 1999;2:434-7.
- Aure K, Fayet G, Leroy JP, Lacene E, Romero NB, Lombes A. Apoptosis in mitochondrial myopathies is linked to mitochondrial proliferation. *Brain* 2006;129:1249-59.
- Aure K, Lombes A. [Diagnostic investigations of mitochondrial diseases with neurological symptoms]. *Rev Neurol (Paris)* 2007;163:254-63.
- Aure K, Mamchaoui K, Frachon P, Butler-Browne GS, Lombes A, Mouly V. Impact on oxidative phosphorylation of immortalization with the telomerase gene. *Neuromuscul Disord* 2007;17:368-75.
- Bandelt H-J, Kong Q-P et al. More evidence for non-maternal inheritance of mitochondrial DNA?. *J Med Genet* 2005 ;42(12): 957-60.
- Bannwarth S, Procaccio V et al. Prevalence of rare mitochondrial DNA mutations in mitochondrial disorders. *J Med Genet* 2013 ;50(10): 704-14.
- Barel O, Shorer Z, Flusser H, et al. Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ. *Am J Hum Genet* 2008;82:1211-6.
- Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 1999;31:347-66.
- Baruffini E, Lodi T, Dallabona C, Puglisi A, Zeviani M, Ferrero I. Genetic and chemical rescue of the *Saccharomyces cerevisiae* phenotype induced by mitochondrial DNA polymerase mutations associated with progressive external ophthalmoplegia in humans. *Hum Mol Genet* 2006;15:2846-55.

- Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2011;476:341-5.
- Beckman G, Lundgren E, Tarnvik A. Superoxide dismutase isozymes in different human tissues, their genetic control and intracellular localization. *Hum Hered* 1973;23:338-45.
- Begriche K, Massart J, Robin MA, et al. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol* 2010;54:773-94.
- Benit P, Lebon S, Rustin P. Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:181-5.
- Bereiter-Hahn J. Distribution and dynamics of mitochondrial nucleoids in animal cells culture. *Exp Biol Online* 1996.
- Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang LS, Crofts AR. Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem* 2000;69:1005-75.
- Birch-Machin MA, Shepherd IM, Watmough NJ, et al. Fatal lactic acidosis in infancy with a defect of complex III of the respiratory chain. *Pediatr Res* 1989;25:553-9.
- Blazquez A, Gil-Borlado MC, Moran M, et al. Infantile mitochondrial encephalomyopathy with unusual phenotype caused by a novel BCS1L mutation in an isolated complex III-deficient patient. *Neuromuscul Disord* 2009;19:143-6.
- Bleier L, Droese S. Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim Biophys Acta* 2013;1827:1320-31.
- Blok MJ, van den Bosch BJ, Jongen E, et al. The unfolding clinical spectrum of POLG mutations. *J Med Genet* 2009;46:776-85.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998;279:349-52.
- Bogenhagen DF. Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta* 2012;1819:914-20.
- Bolden A, Noy GP, Weissbach A. DNA polymerase of mitochondria is a gamma-polymerase. *J Biol Chem* 1977;252:3351-6.
- Bolisetty S, Jaimes EA. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Int J Mol Sci* 2013;14:6306-44.

- Bolla JR, Su CC, Yu EW. Biomolecular membrane protein crystallization. *Philos Mag* (Abingdon) 2012;92:2648-61.
- Bolszak M, Anttonen AK, Komulainen T, et al. Digenic mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsy Res* 2009;85:300-4.
- Bonora M, Patergnani S, Rimessi A, et al. ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal* 2012;8:343-57.
- Bouzidi MF, Carrier H, Godinot C. Antimycin resistance and ubiquinol cytochrome *c* reductase instability associated with a human cytochrome *b* mutation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1317:199-209.
- Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)* 2005;70:231-9.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C817-33.
- Calvaruso MA, Willems P, van den Brand M, et al. Mitochondrial complex III stabilizes complex I in the absence of NDUF54 to provide partial activity. *Hum Mol Genet* 2012;21:115-20.
- Calvo S, Jain M, Xie X, et al. Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat Genet* 2006;38:576-82.
- Camaret BMD. Diagnostic biochimique et moléculaire des cytopathies mitochondriales : actualités et perspectives. In: *Pharmacie JpesFd*, ed. Montpellier 2009.
- Capaldi RA, Halphen DG, Zhang YZ, Yanamura W. Complexity and tissue specificity of the mitochondrial respiratory chain. *J Bioenerg Biomembr* 1988;20:291-311.
- Carroll CJ, Brilhante V, Suomalainen A. Next-generation sequencing for mitochondrial disorders. *Br J Pharmacol* 2013.
- Chabrol BDL, P ed. *Maladies métaboliques héréditaires*. Doin ed: Cochat,P; 2011.
- Chan DC. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:79-99.
- Chan K, Truong D, Shangari N, O'Brien PJ. Drug-induced mitochondrial toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005;1:655-69.
- Chan SS, Copeland WC. DNA polymerase gamma and mitochondrial disease: understanding the consequence of POLG mutations. *Biochim Biophys Acta* 2009;1787:312-9.

- Chan SS, Longley MJ, Copeland WC. Modulation of the W748S mutation in DNA polymerase gamma by the E1143G polymorphism in mitochondrial disorders. *Hum Mol Genet* 2006;15:3473-83.
- Chan SS, Longley MJ, Naviaux RK, Copeland WC. Mono-allelic POLG expression resulting from nonsense-mediated decay and alternative splicing in a patient with Alpers syndrome. *DNA Repair (Amst)* 2005;4:1381-9.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003;160:189-200.
- Chen X, Wei S, Yang F. Mitochondria in the pathogenesis of diabetes: a proteomic view. *Protein Cell* 2012;3:648-60.
- Chinnery PF. Modulating heteroplasmy. *Trends Genet* 2002;18:173-6.
- Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull* 2013;106:135-59.
- Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, et al. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet* 2000;16:500-5.
- Chinnery PF, Zwijsen PJ, Walker M, et al. Nonrandom tissue distribution of mutant mtDNA. *Am J Med Genet* 1999;85:498-501.
- Chretien D, Slama A, Briere JJ, Munnich A, Rotig A, Rustin P. Revisiting pitfalls, problems and tentative solutions for assaying mitochondrial respiratory chain complex III in human samples. *Curr Med Chem* 2004;11:233-9.
- Clayton DA. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7:453-78.
- Coenen MJ, Antonicka H, Ugalde C, et al. Mutant mitochondrial elongation factor G1 and combined oxidative phosphorylation deficiency. *N Engl J Med* 2004;351:2080-6.
- Cohen BH, Naviaux RK. The clinical diagnosis of POLG disease and other mitochondrial DNA depletion disorders. *Methods* 2010;51:364-73.
- Conte L, Zara V. The Rieske Iron-Sulfur Protein: Import and Assembly into the Cytochrome bc(1) Complex of Yeast Mitochondria. *Bioinorg Chem Appl* 2011;2011:363941.
- Copeland WC. Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2012;47:64-74.
- Copeland, W. C. and M. J. Longley. Mitochondrial genome maintenance in health and disease." *DNA Repair (Amst)* 2014 ; 19 (190-198).

- Cortopassi G, Wang E. Modelling the effects of age-related mtDNA mutation accumulation; complex I deficiency, superoxide and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271:171-6.
- Daems WT, Wisse E. Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria. *J Ultrastruct Res* 1966;16:123-40.
- Dairaghi DJ, Shadel GS, Clayton DA. Human mitochondrial transcription factor A and promoter spacing integrity are required for transcription initiation. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271:127-34.
- Darrouzet E, Moser CC, Dutton PL, Daldal F. Large scale domain movement in cytochrome bc(1): a new device for electron transfer in proteins. *Trends Biochem Sci* 2001;26:445-51.
- Davis RE, Williams M. Mitochondrial function and dysfunction: an update. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;342:598-607.
- Davoudi M, Kotarsky H, Hansson E, Fellman V. Complex I Function and Supercomplex Formation Are Preserved in Liver Mitochondria Despite Progressive Complex III Deficiency. *PLoS One* 2014;9:e86767.
- De Coo IF, Renier WO, Ruitenbeek W, et al. A 4-base pair deletion in the mitochondrial cytochrome b gene associated with parkinsonism/MELAS overlap syndrome. *Ann Neurol* 1999;45:130-3.
- de Lonlay P, Valnot I, Barrientos A, et al. A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet* 2001;29:57-60.
- De Meirleir L, Seneca S, Damis E, et al. Clinical and diagnostic characteristics of complex III deficiency due to mutations in the BCS1L gene. *Am J Med Genet A* 2003;121A:126-31.
- De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2011;476:336-40.
- DeFranco AL, RM ; Robertson, M. *Immunité: De Boeck*; 2009.
- Delattre JB, J-L ; Bonnefont-Rousselot, D, ed. *Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques*: Lavoisier; 2005.
- Demongeot J, Glade N, Hansen O, Moreira A. An open issue: the inner mitochondrial membrane (IMM) as a free boundary problem. *Biochimie* 2007;89:1049-57.

- Dencher NA, Frenzel M, Reifschneider NH, Sugawa M, Krause F. Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1100:291-8.
- Deng K, Zhang L, Kachurin AM, et al. Activation of a matrix processing peptidase from the crystalline cytochrome bc1 complex of bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* 1998;273:20752-7.
- Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:870-9.
- Diaz F, Kotarsky H, Fellman V, Moraes CT. Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011;16:197-204.
- DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004;1658:80-8.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95.
- Drose S, Brandt U. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 2008;283:21649-54.
- Dudek J, Rehling P, van der Laan M. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochim Biophys Acta* 2012;1833:274-85.
- Dumoulin R, Sagnol I, Ferlin T, Bozon D, Stepien G, Mousson B. A novel gly290asp mitochondrial cytochrome b mutation linked to a complex III deficiency in progressive exercise intolerance. *Mol Cell Probes* 1996;10:389-91.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-16.
- Favier A. [Oxidative stress: value of its demonstration in medical biology and problems posed by the choice of a marker]. *Ann Biol Clin (Paris)* 1997;55:9-16.
- Fellman V, Kotarsky H. Mitochondrial hepatopathies in the newborn period. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011;16:222-8.
- Fernandez-Vizarra E, Bugiani M, Goffrini P, et al. Impaired complex III assembly associated with BCS1L gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Hum Mol Genet* 2007;16:1241-52.
- Ferramosca A, Zara V. Biogenesis of mitochondrial carrier proteins: molecular mechanisms of import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:494-502.

- Ferraris S, Clark S, Garelli E, et al. Progressive external ophthalmoplegia and vision and hearing loss in a patient with mutations in POLG2 and OPA1. *Arch Neurol* 2008;65:125-31.
- Finsterer, J. and S. Zarrouk Mahjoub. Mitochondrial toxicity of antiepileptic drugs and their tolerability in mitochondrial disorders. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012 ; 8(1): 71-9.
- Fisher N, Castleden CK, Bourges I, Brasseur G, Dujardin G, Meunier B. Human disease-related mutations in cytochrome b studied in yeast. *J Biol Chem* 2004;279:12951-8.
- Foury F, Vanderstraeten S. Yeast mitochondrial DNA mutators with deficient proofreading exonucleolytic activity. *EMBO J* 1992;11:2717-26.
- Fox TD. Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics* 2012;192:1203-34.
- Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 2000;25:319-24.
- Gaignard P, Menezes M, Schiff M, et al. Mutations in CYC1, encoding cytochrome *c*1 subunit of respiratory chain complex III, cause insulin-responsive hyperglycemia. *Am J Hum Genet* 2013;93:384-9.
- Gano L, Patel M, Rho JM. Ketogenic Diets, Mitochondria and Neurological Diseases. *J Lipid Res* 2014.
- Gelfi C, Vasso M, Cerretelli P. Diversity of human skeletal muscle in health and disease: contribution of proteomics. *J Proteomics* 2011;74:774-95.
- Genova ML, Baracca A, Biondi A, et al. Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity? *Biochim Biophys Acta* 2008;1777:740-6.
- Ghezzi D, Arzuffi P, Zordan M, et al. Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Nat Genet* 2011;43:259-63.
- Ghezzi D, Baruffini E, Haack TB, et al. Mutations of the mitochondrial-tRNA modifier MTO1 cause hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis. *Am J Hum Genet* 2012;90:1079-87.
- Gibson GE. Mitochondria and oxidative stress in neurodegenerative disorders: *Annals of the New-York Academy of Sciences*; 2008.

- Gil-Borlado MC, Gonzalez-Hoyuela M, Blazquez A, et al. Pathogenic mutations in the 5' untranslated region of BCS1L mRNA in mitochondrial complex III deficiency. *Mitochondrion* 2009;9:299-305.
- Gilleron M. Cardiotoxicité de la Doxorubicine : Etude in vitro sur lignée cardiomyoblastique H9c2 et ex vivo par le dosage de la tyrosine nitrée en spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide haute performance. Lille: Lille 2; 2009.
- Giorgio V, Von Stockum S, et al. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(15): 5887-92.
- Glancy B, Balaban RS. Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry* 2012;51:2959-73.
- Glover EI, Martin J, Maher A, Thornhill RE, Moran GR, Tarnopolsky MA. A randomized trial of coenzyme Q10 in mitochondrial disorders. *Muscle Nerve* 2010;42:739-48.
- Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990;348:651-3.
- Gowher A, Smirnov A, Tarassov I, Entelis N. Induced tRNA import into human mitochondria: implication of a host aminoacyl-tRNA-synthetase. *PLoS One* 2013;8:e66228.
- Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science* 1999;283:1476-81.
- Graziewicz MA, Longley MJ, Bienstock RJ, Zeviani M, Copeland WC. Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:770-6.
- Mitochondries et peroxysomes. Faculté de médecine de Strasbourg, 2013. (Accessed at http://udsmed.unistra.fr/emed/main/document/document.php?cidReq=PAES1UE2&action=downloadfolder&path=%2FCours_du_Dr._Eric_Guerin&bcsi_scan_628cd39dca2568d2=1.)
- Guérin B. Bioénergétique: EDP Sciences; 2004.
- Gyllenstein U, Wharton D, Wilson AC. Maternal inheritance of mitochondrial DNA during backcrossing of two species of mice. *J Hered* 1985;76:321-4.

- Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. *J Cell Biol* 1968;37:345-69.
- Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 1986;18:331-68.
- Hakonen AH, Heiskanen S, Juvonen V, et al. Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am J Hum Genet* 2005;77:430-41.
- Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006;141:312-22.
- Haut S, Brivet M, Touati G, et al. A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Hum Genet* 2003;113:118-22.
- Haut S, de Villemeur TB, Brivet M, et al. The deleterious G15498A mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome b may remain clinically silent in homoplasmic carriers. *Eur J Hum Genet* 2004;12:220-4.
- Herzig S, Raemy E, Montessuit S, et al. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science* 2012;337:93-6.
- Hinson JT, Fantin VR, Schonberger J, et al. Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Bjornstad syndrome. *N Engl J Med* 2007;356:809-19.
- Hoek JB, Cahill A, Pastorino JG. Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology* 2002;122:2049-63.
- Holt I, ed. *Genetics of mitochondrial diseases*: Oxford University Press; 2003.
- Holt IJ. Mitochondrial DNA replication and repair: all a flap. *Trends Biochem Sci* 2009;34:358-65.
- Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 2000;100:515-24.
- Holt IJ, Reyes A. Human mitochondrial DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4.
- Hopkins SE, Somoza A, Gilbert DL. Rare autosomal dominant POLG1 mutation in a family with metabolic strokes, posterior column spinal degeneration, and multi-endocrine disease. *J Child Neurol* 2010;25:752-6.

- Horvath R, Hudson G, Ferrari G, et al. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain* 2006;129:1674-84.
- http://cochin.inserm.fr/core_facilities/genome-sequencing-studies/pcr-quantitative/la-theorie-de-la-pcr-quantitative/files/principes-de-la-PCRq.pdf.
- <http://tools.niehs.nih.gov/polg/>.
- <http://www.cours-de-biochimie.fr/traduction-arn-proteines.php>.
- Hudson G, Chinnery PF. Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Hum Mol Genet* 2006;15 Spec No 2:R244-52.
- Huttenlocher PR, Solitare GB, Adams G. Infantile diffuse cerebral degeneration with hepatic cirrhosis. *Arch Neurol* 1976;33:186-92.
- Invernizzi F, Tigano M, Dallabona C, et al. A homozygous Mutation in LYRM7/MZM1L Associated with Early Onset Encephalopathy, Lactic Acidosis and Severe Reduction of Mitochondrial Complex III Activity. *Hum Mutat* 2013.
- Iwata S, Lee JW, Okada K, et al. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science* 1998;281:64-71.
- Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1199-207.
- Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, Shoubridge EA. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1996;14:146-51.
- Kaplan J-C DM, ed. *Biologie moléculaire et médecine: Médecine-Sciences* Flammarion; 2007.
- Kasiviswanathan R, Copeland WC. Biochemical analysis of the G517V POLG variant reveals wild-type like activity. *Mitochondrion* 2011;11:929-34.
- Kasiviswanathan R, Longley MJ, Chan SS, Copeland WC. Disease mutations in the human mitochondrial DNA polymerase thumb subdomain impart severe defects in mitochondrial DNA replication. *J Biol Chem* 2009;284:19501-10.
- Kaufmann P, Engelstad K, Wei Y, et al. Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial. *Neurology* 2006;66:324-30.
- Keightley JA, Anitori R, Burton MD, Quan F, Buist NR, Kennaway NG. Mitochondrial encephalomyopathy and complex III deficiency associated with a stop-codon mutation in the cytochrome b gene. *Am J Hum Genet* 2000;67:1400-10.

- Kennaway NG. Defects in the cytochrome bc₁ complex in mitochondrial diseases. *J Bioenerg Biomembr* 1988;20:325-52.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
- King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989;246:500-3.
- Koga Y, Akita Y, Nishioka J, et al. L-arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in MELAS. *Neurology* 2005;64:710-2.
- Kotarsky H, Karikoski R, Morgelin M, et al. Characterization of complex III deficiency and liver dysfunction in GRACILE syndrome caused by a BCS1L mutation. *Mitochondrion* 2010;10:497-509.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:619-42.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.
- Kuzmicic J, Del Campo A, Lopez-Crisosto C, et al. [Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure]. *Rev Esp Cardiol* 2011;64:916-23.
- Kwong JQ, Henning MS, Starkov AA, Manfredi G. The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis. *J Cell Biol* 2007;179:1163-77.
- Lacza Z, Snipes JA, Zhang J, et al. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic Biol Med* 2003;35:1217-28.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- Lagoutte D, Preaux N, Gleye C. Toxicité des médicaments inhibiteurs du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. *Médecine thérapeutique* 2004;10:27-32.
- Lanciano P, Khalfaoui-Hassani B, Selamoglu N, Ghelli A, Rugolo M, Daldal F. Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: a bacterial versus human mitochondrial comparative case study. *Biochim Biophys Acta* 2013;1827:1332-9.
- Lara MC, Weiss B, Illa I, et al. Infusion of platelets transiently reduces nucleoside overload in MNGIE. *Neurology* 2006;67:1461-3.
- Lax NZ, Whittaker RG, Hepplewhite PD, et al. Sensory neuropathy in patients harbouring recessive polymerase gamma mutations. *Brain* 2011;135:62-71.

- Lee YS, Kennedy WD, Yin YW. Structural insight into processive human mitochondrial DNA synthesis and disease-related polymerase mutations. *Cell* 2009;139:312-24.
- Legros F, Chatzoglou E, Frachon P, et al. Functional characterization of novel mutations in the human cytochrome b gene. *Eur J Hum Genet* 2001;9:510-8.
- Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 2002;13:4343-54.
- Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* 2001;52:159-64.
- Lestienne P. Evidence for a direct role of the DNA polymerase gamma in the replication of the human mitochondrial DNA in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;146:1146-53.
- Lestienne P, ed. *Mitochondrial diseases*: Springer; 1999.
- Lewis W, Day BJ, Kohler JJ, et al. Decreased mtDNA, oxidative stress, cardiomyopathy, and death from transgenic cardiac targeted human mutant polymerase gamma. *Lab Invest* 2007;87:326-35.
- Liesa M, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 2009;89:799-845.
- Lombes A, Aure K, Bellanne-Chantelot C, Gilleron M, Jardel C. Unsolved issues related to human mitochondrial diseases. *Biochimie* 2013.
- Longley MJ, Clark S, Yu Wai Man C, et al. Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *Am J Hum Genet* 2006;78:1026-34.
- Luoma P, Melberg A, Rinne JO, et al. Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet* 2004;364:875-82.
- Luoma PT, Luo N, Loscher WN, et al. Functional defects due to spacer-region mutations of human mitochondrial DNA polymerase in a family with an ataxia-myopathy syndrome. *Hum Mol Genet* 2005;14:1907-20.
- Mannella CA, Marko M, Buttle K. Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends Biochem Sci* 1997;22:37-8.

- Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Pierpont ME, Ananthakrishnan R. Impaired mitochondrial function in idiopathic dilated cardiomyopathy: biochemical and molecular analysis. *J Card Fail* 1995;1:285-91.
- Marsy S, Frachon P, Dujardin G, Lombes A, Lemaire C. Respiratory mutations lead to different pleiotropic effects on OXPHOS complexes in yeast and in human cells. *FEBS Lett* 2008;582:3489-93.
- Martin W, Muller M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 1998;392:37-41.
- May-Panloup P, Chretien MF, Malthiery Y, Reynier P. [Mitochondria and reproduction]. *Med Sci (Paris)* 2004;20:779-83.
- Mazat JP, Ransac S. [The cytochrome bc1 complex in the mitochondrial respiratory chain functions according to the Q cycle hypothesis of Mitchell: the proof using a stochastic approach?]. *Med Sci (Paris)* 2010;26:1079-86.
- McFarland R, Clark KM, Morris AA, et al. Multiple neonatal deaths due to a homoplasmic mitochondrial DNA mutation. *Nat Genet* 2002;30:145-6.
- McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial disease--its impact, etiology, and pathology. *Curr Top Dev Biol* 2007;77:113-55.
- McKee EE, Ferguson M, Bentley AT, Marks TA. Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2042-9.
- Medja F, Allouche S, Frachon P, et al. Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 2009;9:331-9.
- Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med* 2009;47:344-56.
- Miles L, Miles MV, Tang PH, et al. Ubiquinol: a potential biomarker for tissue energy requirements and oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2005;360:87-96.
- Milone M, Wong LJ. Diagnosis of mitochondrial myopathies. *Mol Genet Metab* 2013;110:35-41.
- Mitchell P. Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J Theor Biol* 1976;62:327-67.

- Miyake N, Yano S, Sakai C, et al. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous UQCRC2 mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. *Hum Mutat* 2013;34:446-52.
- Monnot S, Gigarel N, Samuels DC, et al. Segregation of mtDNA throughout human embryofetal development: m.3243A>G as a model system. *Hum Mutat* 2011;32:116-25.
- Montoya J, Lopez-Perez MJ, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial DNA transcription and diseases: past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:1179-89.
- Moran M, Marin-Buera L, Gil-Borlado MC, et al. Cellular pathophysiological consequences of BCS1L mutations in mitochondrial complex III enzyme deficiency. *Hum Mutat* 2010;31:930-41.
- Moran NF, Bain MD, Muqit MM, Bax BE. Carrier erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase therapy for MNGIE. *Neurology* 2008;71:686-8.
- Morris AA, Taylor RW, Birch-Machin MA, et al. Neonatal Fanconi syndrome due to deficiency of complex III of the respiratory chain. *Pediatr Nephrol* 1995;9:407-11.
- Mounolou J-C, Lacroute François. Mitochondrial DNA: an advance in eukaryotic cell biology in the 1960s. *Bio Cell* 2005;97:743-8.
- Mourmans J, Wendel U, Bentlage HA, et al. Clinical heterogeneity in respiratory chain complex III deficiency in childhood. *J Neurol Sci* 1997;149:111-7.
- Munnich A, Rustin P. Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet* 2001;106:4-17.
- Murakami E, Feng JY, Lee H, Hanes J, Johnson KA, Anderson KS. Characterization of novel reverse transcriptase and other RNA-associated catalytic activities by human DNA polymerase gamma: importance in mitochondrial DNA replication. *J Biol Chem* 2003;278:36403-9.
- Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol* 2004;55:706-12.
- Nicholls DG. *Bioenergetics 3*: Elsevier Sciences; 2002.
- Okamoto K, Shaw JM. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 2005;39:503-36.
- Pagon R, Adam MP, Bird TD, ed. *Gene reviews*. Seattle: University of Washington; 2012.

- Pagliarini, D. J. and J. Rutter. Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry. *Genes Dev* 2013 ;**27**(24): 2615-27.
- Pennacchio LA, Bergmann A, Fukushima A, Okubo K, Salemi A, Lennon GG. Structure, sequence and location of the UQCRFS1 gene for the human Rieske Fe-S protein. *Gene* 1995;155:207-11.
- Pfeffer G, Majamaa K, Turnbull DM, Thorburn D, Chinnery PF. Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;4:CD004426.
- Piantadosi CA, Suliman HB. Redox regulation of mitochondrial biogenesis. *Free Radic Biol Med* 2012;53:2043-53.
- Piquereau J, Caffin F, Novotova M, et al. Mitochondrial dynamics in the adult cardiomyocytes: which roles for a highly specialized cell? *Front Physiol* 2013;4:102.
- Ponamarev MV, Longley MJ, Nguyen D, Kunkel TA, Copeland WC. Active site mutation in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis. *J Biol Chem* 2002;277:15225-8.
- Pronicka E, Weglewska-Jurkiewicz A, et al. Drug-resistant epilepsy and fulminant valproate liver toxicity. Alpers-Huttenlocher syndrome in two children confirmed post mortem by identification of p.W748S mutation in POLG gene. *Med Sci Monit* 2011 ;17(4): CR203-9.
- Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 1991;266:22028-34.
- Ramos-Arroyo MA, Hualde J, Ayechu A, et al. Clinical and biochemical spectrum of mitochondrial complex III deficiency caused by mutations in the BCS1L gene. *Clin Genet* 2009;75:585-7.
- Ranieri M, Brajkovic S, Riboldi G, et al. Mitochondrial fusion proteins and human diseases. *Neurol Res Int* 2013;2013:293893.
- Ropp PA, Copeland WC. Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase gamma. *Genomics* 1996;36:449-58.
- Rossignol R, Letellier T, Malgat M, Rocher C, Mazat JP. Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem J* 2000;347 Pt 1:45-53.
- Rouzier C, Chaussenot A, Serre V, et al. Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments for the detection of large intragenic POLG rearrangements in a large French cohort. *Eur J Hum Genet* 2014;22:542-50.

- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994;228:35-51.
- Safdar A, Bourgeois JM, Ogborn DI, et al. Endurance exercise rescues progeroid aging and induces systemic mitochondrial rejuvenation in mtDNA mutator mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:4135-40.
- Sambuughin, N., X. Liu, et al. Exome sequencing reveals SCO2 mutations in a family presented with fatal infantile hyperthermia. *J Hum Genet* 2013 ; **58**(4): 226-8.
- Sanchez E, Lobo T, Fox JL, Zeviani M, Winge DR, Fernandez-Vizarra E. LYRM7/MZM1L is a UQCRFS1 chaperone involved in the last steps of mitochondrial Complex III assembly in human cells. *Biochim Biophys Acta* 2013;1827:285-93.
- Saneto RP, Naviaux RK. Polymerase gamma disease through the ages. *Dev Disabil Res Rev* 2010;16:163-74.
- Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 1999;283:1488-93.
- Sarzi E, Bourdon A, Chretien D, et al. Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J Pediatr* 2007;150:531-4, 4 e1-6.
- Satoh M, Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 1991;196:137-40.
- Scalettar BA, Abney JR, Hackenbrock CR. Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:8057-61.
- Schagger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 2000;19:1777-83.
- Schagger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 1991;199:223-31.
- Schapira AH. Mitochondrial disease. *Lancet* 2006;368:70-82.
- Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* 2012;13:878-90.
- Schuelke M, Krude H, Finckh B, et al. Septo-optic dysplasia associated with a new mitochondrial cytochrome b mutation. *Ann Neurol* 2002;51:388-92.
- Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 2002;347:576-80.

- Schwarz TL. Mitochondrial trafficking in neurons. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5.
- Shrader WD, Amagata A, Barnes A, et al. alpha-Tocotrienol quinone modulates oxidative stress response and the biochemistry of aging. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21:3693-8.
- Siddiqi S, Siddiqi S, Mansoor A, et al. Novel mutation in AAA domain of BCS1L causing Bjornstad syndrome. *J Hum Genet* 2013;58:819-21.
- Singh KK, Kulawiec M. Mitochondrial DNA polymorphism and risk of cancer. *Methods Mol Biol* 2009;471:291-303.
- Sjostrand FS. Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature* 1953;171:30-2.
- Smeitink JA, Elpeleg O, Antonicka H, et al. Distinct clinical phenotypes associated with a mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs. *Am J Hum Genet* 2006;79:869-77.
- Smith PM, Fox JL, Winge DR. Biogenesis of the cytochrome bc(1) complex and role of assembly factors. *Biochim Biophys Acta* 2012;1817:276-86.
- Smits P, Smeitink J, van den Heuvel L. Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:737385.
- Soberanes S, Urich D, Baker CM, et al. Mitochondrial complex III-generated oxidants activate ASK1 and JNK to induce alveolar epithelial cell death following exposure to particulate matter air pollution. *J Biol Chem* 2009;284:2176-86.
- Soriano A, Miro O, Mensa J. Mitochondrial toxicity associated with linezolid. *N Engl J Med* 2005;353:2305-6.
- St Clair DK, Porntadavity S, Xu Y, Kinningham K. Transcription regulation of human manganese superoxide dismutase gene. *Methods Enzymol* 2002;349:306-12.
- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* 2006;40:1250-8.
- Stuart GR, Santos JH, Strand MK, Van Houten B, Copeland WC. Mitochondrial and nuclear DNA defects in *Saccharomyces cerevisiae* with mutations in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia. *Hum Mol Genet* 2006;15:363-74.

- Stumpf JD, Bailey CM, Spell D, Stillwagon M, Anderson KS, Copeland WC. mip1 containing mutations associated with mitochondrial disease causes mutagenesis and depletion of mtDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* 2010;19:2123-33.
- Stumpf JD, Copeland WC. Mitochondrial DNA replication and disease: insights from DNA polymerase gamma mutations. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:219-33.
- Stumpf JD, Saneto RP, Copeland WC. Clinical and molecular features of POLG-related mitochondrial disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a011395.
- Szklarczyk R, Huynen M. Mosaic origin of the mitochondrial proteome. *Proteomics* 2010;4012-24.
- Tang S, Wang J, Lee NC, et al. Mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: an ever expanding molecular and clinical spectrum. *J Med Genet* 2011;48:669-81.
- Tarnopolsky MA, Simon DK, Roy BD, et al. Attenuation of free radical production and paracrystalline inclusions by creatine supplementation in a patient with a novel cytochrome b mutation. *Muscle Nerve* 2004;29:537-47.
- Tieu K, Perier C, Caspersen C, et al. D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *J Clin Invest* 2003;112:892-901.
- Trumpower BL. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem* 1990;265:11409-12.
- Tuppen HA, Fehmi J, Czermin B, et al. Long-term survival of neonatal mitochondrial complex III deficiency associated with a novel BCS1L gene mutation. *Mol Genet Metab* 2010;100:345-8.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552:335-44.
- Tzoulis C, Engelsens BA, Telstad W, et al. The spectrum of clinical disease caused by the A467T and W748S POLG mutations: a study of 26 cases. *Brain* 2006;129:1685-92.
- Valnot I, Kassis J, Chretien D, et al. A mitochondrial cytochrome b mutation but no mutations of nuclearly encoded subunits in ubiquinol cytochrome c reductase (complex III) deficiency. *Hum Genet* 1999;104:460-6.

- Van Goethem G, Dermaut B, Lofgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 2001;28:211-2.
- Van Goethem G, Luoma P, Rantamaki M, et al. POLG mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement. *Neurology* 2004;63:1251-7.
- Van Goethem G, Mercelis R, Lofgren A, et al. Patient homozygous for a recessive POLG mutation presents with features of MERRF. *Neurology* 2003;61:1811-3.
- van Raam BJ, Sluiter W, de Wit E, Roos D, Verhoeven AJ, Kuijpers TW. Mitochondrial membrane potential in human neutrophils is maintained by complex III activity in the absence of supercomplex organisation. *PLoS One* 2008;3:e2013.
- Vartak R, Porras CA, Bai Y. Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein Cell* 2013;4:582-90.
- Visapaa I, Fellman V, Vesa J, et al. GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am J Hum Genet* 2002;71:863-76.
- Vittecoq D, Jardel C, Barthelemy C, et al. Mitochondrial damage associated with long-term antiretroviral treatment: associated alteration or causal disorder? *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;31:299-308.
- Voet D, ed. *Biochimie*. 2th ed: De Boeck; 2005.
- Vogel F, Bornhovd C, Neupert W, Reichert AS. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 2006;175:237-47.
- Wai T, Teoli D, Shoubridge EA. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat Genet* 2008;40:1484-8.
- Walter MC, Czermin B, Muller-Ziermann S, et al. Late-onset ptosis and myopathy in a patient with a heterozygous insertion in POLG2. *J Neurol* 2010;257:1517-23.
- Wang Y, Mohsen AW, Mihalik SJ, Goetzman ES, Vockley J. Evidence for physical association of mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation complexes. *J Biol Chem* 2010;285:29834-41.
- Wanrooij S, Luoma P, van Goethem G, van Broeckhoven C, Suomalainen A, Spelbrink JN. Twinkle and POLG defects enhance age-dependent accumulation of mutations in the control region of mtDNA. *Nucleic Acids Res* 2004;32:3053-64.

- Wibrand F, Ravn K, Schwartz M, Rosenberg T, Horn N, Vissing J. Multisystem disorder associated with a missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene. *Ann Neurol* 2001;50:540-3.
- Winterthun S, Ferrari G, He L, et al. Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations. *Neurology* 2005;64:1204-8.
- Wittig I, Carrozzo R, Santorelli FM, Schagger H. Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis* 2007;28:3811-20.
- Wolff JN, White DJ, Woodhams M, White HE, Gemmell NJ. The strength and timing of the mitochondrial bottleneck in salmon suggests a conserved mechanism in vertebrates. *PLoS One* 2011;6:e20522.
- Wong LJ. Next generation molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 2013;13:379-87.
- Wong LJ, Naviaux RK, Brunetti-Pierri N, et al. Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations. *Hum Mutat* 2008;29:E150-72.
- Wong LJ, Scaglia F, Graham BH, Craigen WJ. Current molecular diagnostic algorithm for mitochondrial disorders. *Mol Genet Metab* 2010;100:111-7.
- Wurm CA, Jakobs S. Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett* 2006;580:5628-34.
- Xia D, Yu CA, Kim H, et al. Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* 1997;277:60-6.
- Yamashita H, Avraham S, Jiang S, et al. Characterization of human and murine PMP20 peroxisomal proteins that exhibit antioxidant activity in vitro. *J Biol Chem* 1999;274:29897-904.
- Yanagishita T, Sugiura K, Kawamoto Y, et al. A case of Bjornstad syndrome caused by novel compound heterozygous mutations in the BCS1L gene. *Br J Dermatol* 2013;170:970-3.
- Young MJ, Longley MJ, Li FY, Kasiviswanathan R, Wong LJ, Copeland WC. Biochemical analysis of human POLG2 variants associated with mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 2011;20:3052-66.
- Yu CA, Tian H, Zhang L, et al. Structural basis of multifunctional bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *J Bioenerg Biomembr* 1999;31:191-9.

- Yu-Wai-Man P, Votruba M, Moore AT, Chinnery PF. Treatment strategies for inherited optic neuropathies: past, present and future. *Eye (Lond)* 2014;28:521-37.
- Zapico SC, Ubelaker DH. mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences. *Aging Dis* 2013;4:364-80.
- Zara V, Conte L, Trumpower BL. Biogenesis of the yeast cytochrome bc1 complex. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:89-96.
- Zhang L, Chan SS, Wolff DJ. Mitochondrial disorders of DNA polymerase gamma dysfunction: from anatomic to molecular pathology diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:925-34.
- Zhang Z, Huang L, Shulmeister VM, et al. Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature* 1998;392:677-84.
- Zick M, Rabl R, Reichert AS. Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:5-19.
- Zimmer C. Origins. On the origin of eukaryotes. *Science* 2009;325:666-8.
- Zullo SJ, Butler L, Zahorchak RJ, Macville M, Wilkes C, Merrill CR. Localization by fluorescence in situ hybridization (FISH) of human mitochondrial polymerase gamma (POLG) to human chromosome band 15q24-->q26, and of mouse mitochondrial polymerase gamma (Polg) to mouse chromosome band 7E, with confirmation by direct sequence analysis of bacterial artificial chromosomes (BACs). *Cytogenet Cell Genet* 1997;78:281-4.

IX. Annexes

	I	II	III	IV	CS	II+III	CI/ CS	CII/ CS	CIII/ CS	CIV/ CS	CII+III/ CS
P2	14	26	58	59	163	10	0,09	0,16	0,36	0,36	0,06
P6	13	24	77	24	80	9	0,16	0,30	0,96	0,30	0,11
P7	37	45	46	36	206	25	0,18	0,22	0,22	0,17	0,12
P12	43	22	58	69	369	10	0,12	0,06	0,16	0,19	0,03
P13	21	39	72	61	310	11	0,08	0,14	0,23	0,22	0,04
P15	22	16	71	38	131	8	0,17	0,12	0,54	0,29	0,06
VN	15- 31	21- 41	76- 140	37- 78	114- 201	11- 27	0,10- 0,20	0,13- 0,29	0,49- 0,98	0,24- 0,53	0,08- 0,18
P10	30	48	139	120	199	28	0,15	0,24	0,70	0,60	0,14
P11	29	35	67	135	123	19	0,24	0,28	0,54	1,10	0,15
P14	9	22	17	40	77	16	0,12	0,29	0,22	0,52	0,21
VN	27- 53	42- 60	110- 185	130- 195	150- 250	35- 55	0,18- 0,28	0,23- 0,35	0,5- 1,0	0,7- 1,0	0,17- 0,29

Tableau 1 : Activités des complexes de la chaîne respiratoire sur biopsie musculaire

I =activité spécifique du complexe I, sensible à la roténone ; II =complexe II ; III =activité spécifique du complexe III sensible à l'antimycine ; IV =complexe IV ; CS =citrate synthase ; II+III =activité combinée des complexes II et III ; VN =valeurs normales. Les données en bleu foncé correspondent aux protocoles antérieurs à la mise en place des protocoles consensus dont les valeurs sont en vert. Les valeurs normales (VN) de chacun de ces protocoles sont indiquées en gras.

	I	II	III	IV	CS	II+III	CI/ CS	CII/ CS	CIII/ CS	CIV/ CS	CII+III/ CS
P1	12	179	10	210	131		0,09	1,37	0,08	1,60	
VN	19- 26	168- 277	143- 192	202- 319	63- 131		0,14- 0,41	1,28- 4,4	1,09- 3,04	1,54- 3,2	
P3	15	64	10	19	48	5	0,31	1,33	0,21	0,40	0,10
Sœur de P3	16	80	19	42	37	8	0,43	2,16	0,51	1,14	0,22
P6	25	35	23	24	59	14	0,42	0,59	0,39	0,41	0,24
P7	38	66	27	19	41	23	0,93	1,61	0,66	0,46	0,56
P15	21	27	32	85	109	12	0,19	0,25	0,29	0,78	0,11
VN	14- 38	50- 102	38- 70	21- 52	30- 91	15- 32	0,21- 0,61	0,67- 2,36	0,51- 1,45	0,27- 0,58	0,20- 1,01
P5	25	128	75	67	75	33	0,33	1,71	1,00	0,89	0,44
P9	54	105	0	88	93	16	0,58	1,13	0,00	0,95	0,17
VN	23- 37	90- 150	68- 106	73- 100	66- 86	48- 62	0,35- 0,50	1,70- 2,50	1,00- 1,40	1,00- 1,40	0,65- 1,10

Tableau 2 : Dosage des activités des complexes de la chaîne respiratoire sur biopsie hépatique

I =activité spécifique du complexe I, sensible à la roténone ; II =complexe II ; III =activité spécifique du complexe III sensible à l'antimycine ; IV =complexe IV ; CS =citrate synthase ; II+III =activité combinée des complexes II et III ; VN =valeurs normales. Les données en bleu foncé correspondent aux protocoles antérieurs à la mise en place des protocoles consensus dont les valeurs sont en vert. Les valeurs normales (VN) de chacun de ces protocoles sont indiquées en gras.

Données de la littérature pour P1 {Haut, 2003}

	II	III	IV	CS	CII/CS	CIII/CS	CIV/CS
P1	32	55	170	145	0,22	0,38	1,17
P4	20	48	143	74	0,27	0,60	1,90
VN	14-33	75-237	85-269	36-85	0,05-0,39	1,2-1,6	1,6-3,2

Tableau 3 : Dosage des activités des complexes de la chaîne respiratoire sur lymphocytes

II =complexe II ; III =activité spécifique du complexe III sensible à l'antimycine ; IV =complexe IV ; CS =citrate synthase ; VN =valeurs normales. Valeurs extraites de la publication de ces deux cas par l'équipe de Bicêtre {Haut, 2003 ; Haut, 2004}

Patients	II	III	IV	CS	III/CS	III/II	IV/CS	IV/II	III/IV
P1	28	22	51	54	0,39	0,77	0,95	1,87	0,43
P2	44	45	53	88	0,52	1,08	0,60	1,22	1,16
P4	35	31	62	67	0,48	0,88	0,98	1,81	0,49
P5	30	27	81	73	0,34	0,77	1,06	2,77	0,34
P6	45	54	45	95	0,57	1,23	0,46	0,98	1,40
P7	37	67	60	86	0,83	1,97	0,72	1,71	1,48
P8	25	26	77	79	0,32	0,99	0,95	2,93	0,33
P9	25	13	78	111	0,16	0,50	0,76	3,32	0,20
P10	29	23	52	66	0,36	0,86	0,79	2,01	0,46
P11	28	29	65	66	0,44	1,03	0,95	2,38	0,44
P13	20	13	63	55	0,22	0,56	1,15	3,15	0,21
P14	32	18	80	89	0,18	0,53	0,89	2,41	0,21
P15	44	56	55	73	0,80	1,36	0,69	1,14	1,51
95 ^{ème} centile	44	81	116	110	1,42	3,98	1,57	5,16	1,37
5 ^{ème} centile	13	22	53	43	0,32	0,85	0,74	1,85	0,27

Tableau 4 : Activités respiratoires des fibroblastes primaires

II =complexe II ; III =activité spécifique du complexe III sensible à l'antimycine ; IV =complexe IV ; CS =citrate synthase ; Valeurs anormales en rouge

	II	III	IV	CS	III/CS	III/II	IV/CS	IV/II	III/IV
P3	29	14	50	63	0,23	0,47	0,78	1,68	0,31
P12	34	1	69	95	0,00	0,01	0,73	2,06	0,01
P13	35	7	115	176	0,04	0,21	0,66	3,44	0,07
95 ^{ème} centile	35	65	104	101	0,94	2,40	1,68	4,77	0,68
5 ^{ème} centile	21	22	57	39	0,23	0,73	0,83	2,08	0,28

Tableau 5 : Activités respiratoires des fibroblastes immortalisés par le gène de la télomérase (HTRT)

II =complexe II ; III =activité spécifique du complexe III sensible à l'antimycine ; IV =complexe IV ; CS =citrate synthase ; Valeurs anormales en rouge

		Respiration basale	ATP	fuite	reserve	max	RCR basal	RCR max
Contrôles	Moyennes	38	28	9	92	128	4,38	15,43
	SD	12	10	4	38	48	1,55	7,38
	nombre	40	40	40	40	40	40	40
	10eme centile	24	16	5	53	75	2,70	8,31
	90eme centile	50	41	14	132	182	6,69	25,85
Patients								
P1	Moyenne	32	24	9	46	75	4,07	9,41
	SD	4	7	3	12	17	1,73	4,38
P2	Moyenne	32	23	9	82	114	3,52	13,11
	SD	11	9	3	8	18	0,80	3,24
P3	Moyenne	30	60	22	170	102	4,36	16,83
	SD	18	61	22	148	231	2,57	16,93
P4	Moyenne	35	23	8	67	103	4,10	14,69
	SD	8	12	4	15	23	2,04	7,71
P5	Moyenne	41	32	9	71	112	4,51	12,26
	SD	9	6	3	26	34	0,41	2,51
P6	Moyenne	25	20	5	50	75	6,34	20,12
	SD	11	7	3	18	21	2,44	8,58
P7	Moyenne	28	22	7	66	95	4,47	14,25
	SD	6	4	2	32	38	0,91	1,60
P8	Moyenne	23	18	4	36	59	5,35	14,01
	SD	3	2	1	3	0	0,55	3,41
P9	Moyenne	33	24	9	64	94	3,84	11,67
	SD	16	13	4	27	35	1,59	6,46
P10	Moyenne	34	26	8	89	123	4,33	16,07
	SD	10	7	4	18	27	1,07	5,19
P11	Moyenne	38	28	11	64	101	4,03	11,67
	SD	6	3	4	18	12	1,47	7,42
P12	Moyenne	12	7	6	18	31	2,21	5,28
	SD	4	2	2	9	13	0,18	0,73
P13	Moyenne	21	16	4	41	62	4,71	14,40
	SD	12	10	2	23	35	2,20	8,03
P14	Moyenne	37	27	10	79	117	3,78	12,00
	SD	7	3	4	9	15	0,65	2,78
P15	Moyenne	38	31	8	89	120	5,10	15,98
	SD	4	4	0	5	9	0,60	1,56

Tableau 6 : résultats des analyses polarographiques
SD : écart-type, RCR : respiratory control ratio

	Gène muté	Activités	Respiration	Stress oxydant			Potentiel membranaire	Temps de doublement	Stress métabolique	Apoptose	Structure	Assemblage
		III/IV	Basale/ Maximale	Production Base/OM/AM	Défenses Prx3/SOD2	Dommages Nitrotyrosine		Glucose/ Galactose		Base/ Staurosporine/Etoposide	UQCRC2/ISP	
P1	UQCRB	40 %/62%	N/DS	N/N/N	N/A	N	N	N	Galactose	N	D++/D++	I/V
P4	MT-CYB	56%/76%	N/N	N/N/N	N/N	N	N	/	/	/	D/D	IV
P14	MT-CYB	33%/98%	N/N	N/N/N	N/A	N	N	A/A	Galactose	N	D/N	I
P12	CYC1	2%/90%	DS/DS	N/N/N	N/A	N	N	N/A++	Galactose	Staurosporine	D++/D	I/III+
P9	LYRM7	24%/96%	N/N	N/N/N	N/A	N	D	A/A++	glucose 25mM, Déoxyglucose, tBHP100, 200	N	N/D++	I/III+/IV/V
P2	BCS1L	81%/65%	N/N	AS/AS/AS	N/N	N	/	/	/	/	0	N
P3	BCS1L	26%/60%	N/N	N/AS/N	N/N	N	DS	/	/	N	N/N	I/IV
P5	/	66%/99%	N/N	N/N/N	N/A	N	N	/	N	N	N/D	I/IV
P6	/	98%/55%	DS/DS	N/N/N	N/N	N	N	N	/	N	D++/D	I+
P7	/	100%/73%	N/N	AS/AS/AS	N/A	N	DS	A/A	Déoxyglucose	N	N/D++	N
P8	/	47%/94%	DS/DS	N/N/N	N/A	N	N	/	/	3 conditions	D++/D++	N
P10	/	42%/63%	N/N	AS/AS/N	N/N	N	/	/	/	/	N/N	I/IV
P11	/	53%/80%	N/N	AS/AS/N	N/N	N	/	/	/	/	D/D	I/IV
P13	/	16%/100%	DS/DS	N/N/N	N/A	N	DS	A++/A++	Galactose, tBHP100, 200 et 400	N	D++/++	I/III+
P15	/	98%/89%	N/N	N/N/N	N/A	N	N	A/A++	/	N	N/D	N

Tableau 7 : récapitulatif des données obtenues lors de l'étude des patients déficitaires en complexe III

Les activités de la chaîne respiratoire sont données en % par rapport à la valeur du contrôle.

N : normal ; D : diminution ; DS : diminution significative ; D++ : diminution importante ; A : augmentation ; AS : Augmentation significative ; A++ : augmentation importante ; / : analyse non réalisée ; OM : oligomycine ; AM : antimycine ; Prx3 : peroxyredoxine 3 ; SOD2 : superoxyde dismutase 2 ; tBHP : tert-ButylHydroperoxide.

Dans les colonnes « stress métabolique » et « apoptose », sont indiquées les conditions pour lesquelles des anomalies ont pu être observées. Dans la colonne « assemblage », sont indiqués les complexes apparaissant en quantité diminuée. Pour les lignées cellulaires P1 à P15, les déficits isolés en CIII sont en orange, ceux en CIV en bleu et ceux en CIII+IV en vert.

Gènes mutés codant pour : sous-unité structurale du complexe III, sous-unité catalytique du complexe III, facteur d'assemblage

A diagnostic flowchart for POLG related diseases based on signs sensitivity and specificity

Journal:	<i>Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry</i>
Manuscript ID:	jnnp-2013-306799.R1
Article Type:	Research paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Tchikviladzé, Maya; AP-HP, Hopital de La Salpêtrière, Department of Neurology Gilleron, Mylene; AP-HP, Hopital de La Salpêtrière, Biochimie Metabolique Maisonnobe, Thierry; Hôpital de la Salpêtrière, 8. Centre de Référence Maladies Neuromusculaires Rares Galanaud, Damien; Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Neuroradiologie Laforêt, Pascal; Myology Institute Paris Durr, Alexandra; AP-HP, Hopital de La Salpêtrière, Department of Genetics Eymard, Bruno Mochel, Fanny; INSERM U975, Paris, France, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière-CRICM ogier de baulny, helene Behin, Anthony; AP-HP, Hopital de La Salpêtrière, Institut de Myologie Stojkovic, Tanya; Hôpital de la Salpêtrière, Service d'Exploration Fonctionnelle degos, bertrand; Hôpital Pitié-Salpêtrière, Gourfinkel-An, Isabelle; AP-HP, Hopital de La Salpêtrière, Centre de reference Epilepsies rares Sedel, Frédéric; AP-HP, Hôpital de La salpêtrière, Fédération de Neurologie Anheim, Mathieu; Hopital de Hautepierre, service de Neurologie Elbaz, Alexis; Inserm, CESP, U1018 Viala, Karine; Pitie-Salpetriere Hospital, Department of clinical Neurophysiology Vidailhet, Marie; AP-HP, Hopital de La Salpêtrière, Neurometabolic Unit Brice, Alexis; Hopital de la Salpetriere Jardel, Claude; AP-HP, Hôpital de La salpêtrière, Service de Biochimie métabolique Lombes, Anne; Inserm, Institut Cochin; AP-HP, Hôpital de La Salpêtrière</p>
Keywords:	MITOCHONDRIAL DISORDERS, GENETICS, CLINICAL NEUROLOGY, EMG
Specialty:	Neuromuscular

SCHOLARONE™
Manuscripts

Confidential: For Review Only

A diagnostic flowchart for *POLG* related diseases based on signs sensitivity and specificity

Maya Tchikviladzé, MD^{1,2*}, Mylène Gilleron, PharmD^{3,4,5*}, Thierry Maisonobe, MD⁶, Damien Galanaud, MD PhD⁷, Pascal Laforêt, MD PhD⁸, Alexandra Durr, MD PhD^{5,9,10,11}, Bruno Eymard, MD PhD^{5,8,10}, Fanny Mochel, MD PhD^{9,10,12}, Hélène Ogier, MD¹³, Anthony Béhin, MD⁸, Tanya Stojkovic, MD⁸, Bertrand Degos, MD PhD¹, Isabelle Gourfinkel-An, MD¹⁴, Frederic Sedel, MD PhD^{9,10,12}, Mathieu Anheim, MD PhD¹, Alexis Elbaz, MD PhD^{15,16}, Karine Viala, MD⁶, Marie Vidailhet, MD PhD^{1, 10,11,12}, Alexis Brice, MD PhD^{5,9,10,11}, Claude Jardel, PharmD PhD^{3,4}, Anne Lombès, MD PhD^{3,4,17}, &

¹ AP-HP, Department of Neurology, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, F-75651 France

² INSERM CIC9503, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, F-75651 France

³ INSERM U1016, Institut Cochin; CNRS UMR 8104, Paris, F-75014 France

⁴ AP-HP, Service de Biochimie Métabolique et Centre de Génétique moléculaire et chromosomique, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, F-75651 France

⁵ UPMC Univ Paris 06, UMR_S975, F-75013, Paris, France

⁶ AP-HP, Department of Neurophysiology and Neuropathology, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, F-75651 France

⁷ AP-HP, Department of Neuroradiology, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, F-75651 France

⁸ AP-HP, Centre de Référence de pathologie neuromusculaire Paris-Est, Institut de Myologie, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, F-75651 France

⁹ AP-HP, Department of Genetics, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, F-75651 France

¹⁰ INSERM UMR_S975, CRICM; CNRS UMR 7225, F-75013, Paris, France

¹¹ ICM (Brain and Spine Institute) GH Pitié-Salpêtrière, Paris, F-75651 France

¹² AP-HP, Neurometabolic Unit, GH Pitié-Salpêtrière, Paris, F-75651 France

¹³ AP-HP, Maladies héréditaires du métabolisme, GH Robert Debré, Paris, F-75019 France

¹⁴ AP-HP, Centre de référence Epilepsies rares, GH Pitié-Salpêtrière, Paris, F-75651 France

¹⁵ INSERM, CESP, Social and occupational determinants of health, U1018, F-94807, Villejuif

¹⁶ Université Versailles St-Quentin, UMRS 1018, F-94807, Villejuif, France;

¹⁷ Université Paris-Descartes-Paris5, Paris, F-75014 France;

*These two authors equally contributed to the paper.

& Author to whom correspondence should be sent at Inserm 1016-Institut Cochin, Faculté de
medicine, 24 rue du Fb St Jacques, Paris F-75014, France; telephone (33) 1 53732753, FAX
(33) 1 53732757; mail: anne.lombes@inserm.fr

Keywords: Mitochondrial disorders, genetics, clinical neurology, EMG

Word count: Title: 91 characters, Abstract: 248 words, text: 2863 words; 41 references; 4
figures, 4 tables, supplemental web only data: supplemental Table 1, supplemental Table 2,
flow diagram.

ABSTRACT

Objective

Mitochondrial diseases are reputed to have very diverse clinical presentations, often reported as syndromes. This is the case for diseases due to mutations of *POLG* gene, encoding the mitochondrial DNA polymerase, which have been proposed to cause up to 25% adult mitochondrial diseases. Our objective was the evaluation of the specificity and sensitivity of the signs considered indicative of a *POLG*-related disease.

Design

Forty four patients out of 154 with sequenced *POLG* gene had mutations affecting either one (*POLG*^{+/-} group) or two *POLG* alleles (*POLG*^{+/+} group). Phenotyping included clinical signs, electroneuromyography and brain imaging while mitochondrial investigations encompassed muscle histochemistry, respiratory chain assays and search for multiple mitochondrial deletions. The specificity and sensitivity of the signs associated with *POLG* mutations were analyzed by comparison between *POLG*^{+/+} and patients without *POLG* mutation (*POLG*^{-/-} group).

Results

High sensitivity but low specificity was observed with single signs such as axonal sensory neuropathy, cerebellar syndrome, movement disorders and weakness involving ocular, pharyngeal, axial and/or limb muscles. Specificity was increased with combination of previous signs plus psychiatric symptoms, cognitive impairment and epilepsy. High specificity and sensitivity was only obtained with sensory neuronopathy associated with weakness of ocular, pharyngeal, axial and/or limb muscles. Mitochondrial investigations did not suffice for diagnosis. The widespread neuromuscular signs were often present since disease onset and were the rule above 50 years of age.

Conclusion

This large series of patients show that phenotypes associated with *POLG* mutations follow a reproducible pattern, which allows establishing a diagnostic flowchart.

Confidential: For Review Only

INTRODUCTION

Mitochondrial diseases are reputed to have very diverse clinical presentations, often reported as syndromes. This is particularly the case for diseases due to mutations of *POLG* gene, encoding the mitochondrial DNA (mtDNA) polymerase. These mutations have first been involved in 2001 in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia.[1] Since then, their phenotypic spectrum has considerably broadened, including dominant or more often recessive diseases, often described as syndromes. The most severe presentation is Alpers-Huttenlocher syndrome that associates refractory seizures, psychomotor retardation and liver failure occurring in the first years of life.[2] Most syndromes associated with *POLG* mutations have however a much later onset, ranging from adolescence to adulthood.[3] They include Spino-Cerebellar Ataxia with Epilepsy (SCAE),[4] Mitochondrial Recessive Ataxia Syndrome (MIRAS),[5] Sensory Ataxic Neuropathy with Dysarthria and Ophthalmoplegia (SANDO),[6, 7] Myoclonus, Epilepsy, Myopathy, Sensory Ataxia (MEMSA),[8] and Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes (MELAS).[9] In addition *POLG* mutations have been associated with chronic intestinal pseudo-obstruction,[10, 11] occipital lobe epilepsy with status epilepticus,[12] non syndromic childhood-onset intractable epilepsy,[13] Charcot Marie Tooth-like disease,[14] and autosomal dominant distal myopathy.[15]

As expected from such diverse phenotypes, *POLG* mutations have progressively been considered a major cause of mitochondrial diseases, possibly accounting for up to 25% of them.[16] As a consequence, the demands for *POLG* sequencing have steadily increased. However the proportion of positive results has concomitantly largely decreased leading to question the diagnostic flowchart of *POLG*-related diseases.

In this study we gathered sufficient information on 154 patients whose *POLG* gene had been sequenced to address the sensitivity (presence in positive diagnoses) and specificity (absence

in negative diagnoses) of the signs considered indicative of *POLG*-related diseases. The patients were essentially recruited in a large referral centre for adult neurological diseases and thus widely represented diverse neurological entries for “plausible *POLG* mutations”. Clinical signs, electrophysiological data, brain MRI and mitochondrial investigations (lactatemia, histochemistry, enzymatic assays and search for mtDNA deletions in muscle) were retrospectively retrieved from the patients’ records. Relevant *POLG* mutations were found in 44 patients. Comparison of the patients with unquestionable recessive *POLG* mutations with those without *POLG* mutation allowed highlighting that *POLG* mutations are responsible for a reproducible pattern of disease. High sensitivity and specificity were only obtained with combination of signs emphasizing that the main characteristic of *POLG*-related diseases is the concomitant widespread neurological dysfunction including sensory axonal neuropathy, muscle weakness involving ocular, pharyngeal, axial and/or limb muscles, movement disorders, and/or psychiatric symptoms. A diagnostic flowchart based on clinical signs, in isolation or associated with mitochondrial investigations, is proposed based on the recognition of the specific and sensitive signs associated with *POLG* mutations.

PATIENTS AND METHODS

Patients

The *POLG* gene of 311 patients was sequenced in the Department of Metabolic Biochemistry of La Salpêtrière Hospital from 2003 to 2012 and compared to *POLG* reference sequence (GenBank Accession No: NM-002693.2). Sufficient initial and follow-up information was retrospectively obtained for 154 patients, 122 being followed by National Reference Centres for Neuromuscular and/or Rare Neurogenetic diseases in La Salpêtrière Hospital and 32 in Neurology departments of Paris hospitals. Written informed consent was obtained from all patients according to the ethical committee.

Case history with age at onset of the signs was retrospectively established from the patients' charts.

Brain imaging

Brain MRI was performed at 1.5 Tesla, including at least one T1-weighted and one T2 weighted sequences. All brain images were reviewed by both a neuroradiologist (D.G) and a neurologist (M.T) taking into account the patient's age.

Electroneuromyography

Electroneuromyographic study results were reviewed by a neurophysiologist (T.M) and a neurologist (M.T). Nerve conduction studies (sensory and motor conduction velocities, action potentials and motor distal latencies) determined the type of neuropathy.[17]

Mitochondrial investigations

Muscle histochemistry and enzymatic assays were performed as described.[18, 19] Long range PCR searched for the presence of multiple mtDNA deletions in muscle.[20] When it showed a single additional band, the presence of a single mtDNA deletion was excluded by Southern blot.

Statistical analyses

Proportions were compared with Fisher exact or chi2 test, using Yates correction for continuity when appropriate. Means were compared with Mann and Whitney or Anova on ranks. For multiple comparisons Bonferroni or Holm-Bonferroni method of correction was applied.

RESULTS

***POLG* mutations**

Thirty-three *POLG* potential deleterious mutations were found. Their spectrum is provided for comparison with previous reports from Europe,[21, 22] and the USA (Table e-1).[3, 8]

Nineteen mutations were either novel or with “unclassified” status with respect to pathogenicity. Ascertaining their deleterious potential was not completely straightforward. Functional assays are usually not available in the context of a diagnostic setting and their results do not necessarily translate into clinical terms [23]. However, they have been performed for a limited set of mutations. In addition, the diverse *POLG* mutations associated to diseases are collated in a very useful and well-maintained database (<http://tools.niehs.nih.gov/POLG/>) that however cannot provide an answer for all suspected mutations. Prediction software is therefore an essential tool even if results may differ between software application as shown by the fact that a global score taking into account the four most commonly used software applications gave values as low as 1/4 for established deleterious mutations.

In recessive cases, we could reliably assess the mutations deleterious nature based on their high score with prediction software, association *in trans* with known deleterious mutations, and/or previous deleterious changes of the same amino-acid. The sole remaining disputable mutation within that group was mutation p.Gly517Val, which we considered responsible in a homozygous state for the patient phenotype. That mutation has been reported as a dominant mutation in many patients with diverse symptoms.[8, 21, 22, 24, 25] It was once considered recessive *in trans* with p.Arg722His.[26] It is a rare variant (rs61752783 at www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) considered a polymorphism by prediction software and has been shown to induce *in vitro* 20% decreased activity without modification of the overall catalytic efficiency.[27]

For the 10 mutations affecting only one *POLG* allele, pathogenicity was established for only two recognized dominant mutations (p.Arg943Cys and p.Tyr955Cys). Eight patients had either novel mutations (p.Gly365Ala and p.Val1177Leu), “unclassified variants” (p.Phe88Leu, p.Gly268Ala and p.Leu392Val) or mutations considered recessive

(p.Gly848Ser in two patients and p.Pro1073Lys). Absence of available family members prevented searching for mutation segregation with disease.

Clinical presentation

The patients were classified into three groups: $POLG^{+/+}$, $POLG^{+/-}$ and $POLG^{-/-}$ that respectively comprised 34 patients with deleterious mutations on both $POLG$ alleles, 10 patients with only one mutant $POLG$ allele and 110 patients with normal $POLG$ sequence.

The three groups did not differ with respect to age, gender, disease duration and age at disease onset. The causal relationship between disease and mutation being disputable in the $POLG^{+/-}$ group, comparison of the signs sensitivity and specificity were only made between the $POLG^{-/-}$ and $POLG^{+/+}$ groups.

Individual neurological signs are listed in Table 1 following their decreasing frequency in the whole patients' population. Additional signs, present in less than 10% of the patients, included cataract (9%), dysphonia (8%), retinitis pigmentosa (6%), gastro-intestinal pseudo-obstruction (6%) and optic atrophy (5%). The frequency of several signs differed between $POLG^{+/+}$ and $POLG^{-/-}$ group showing that the recruitment bias had not erased phenotypic differences related to genotype. Peripheral neuropathy, psychiatric symptoms, ptosis, ophthalmoplegia, dysphagia ($p < 0.001$ for each when the significance was established at $p = 0.003$ after Bonferroni correction), and axial and/or limb muscle weakness ($p = 0.003$) were significantly more frequent in the $POLG^{+/+}$ than in the $POLG^{-/-}$ group. Conversely, a bilateral pyramidal syndrome was never observed in $POLG^{+/+}$ patients. A positive unilateral extensor response was observed in four $POLG^{+/+}$ patients but it was unilateral and never associated with spasticity or increased reflexes.

The predictive diagnostic value of a sign is based on both its sensitivity (presence in $POLG^{+/+}$ patients) and specificity (absence in $POLG^{-/-}$ patients). Cardinal $POLG$ -related presentations such as peripheral sensory neuropathy, ophthalmoplegia, ptosis and cerebellar syndrome had

a sensitivity above 60%, which was expected with a positive recruitment towards *POLG*-related disease. However they had low specificity except for ptosis and ophthalmoplegia whose specificity was above 60%. On the other hand, several signs disclosed specificity above 60% but low sensitivity as they were relatively rare in *POLG*^{+/+} patients. Among them muscle signs (dysphagia and axial or limb muscle weakness) were the most sensitive (57% and 54% respectively).

POLG^{+/+} patients presented with a higher number of associated signs than *POLG*^{-/-} patients (6.7±2.0 per patient as compared to 3.7±1.8, p<0.001) (Figure 1). Even after Holm-Bonferroni correction for multiple comparisons (90 in that case) several associations were significantly more frequent in *POLG*^{+/+} patients than in *POLG*^{-/-} patients (supplemental Table e-2). The signs involved in significant associations were, by decreasing frequency, ptosis, ophthalmoplegia, psychiatric symptoms, dysphagia, limb muscle weakness, sensory neuropathy, axial muscle weakness, movement disorders, cerebellar syndrome, hypoacusia and cognitive defects.

Sensitivity and specificity were both above 70 % for sensory neuropathy associated with ophthalmoplegia or ptosis, and for ptosis associated with ophthalmoplegia. They dropped to 60% for sensory neuropathy with cerebellar syndrome. All other associations had relatively low sensitivity (around or below 50%) but very high specificity.

Mitochondrial investigations

Patients' recruitment was not based upon previous mitochondrial investigations. As a result, apart from muscle histology that was widely performed, measurement of lactate levels, assays of the mitochondrial respiratory chain complexes activity and search for multiple mtDNA deletions in muscle were only obtained in half of the patients, in proportions similar in all patients groups (Table 2). Despite the lowered statistical power due to relatively low numbers of patients, abnormal histology was more frequently observed in the *POLG*^{+/+} group (96% vs

68% in the *POLG*^{-/-} group, $p=0.006$ when the significance was established at $p=0.012$ after Bonferroni correction). The frequency of multiple mtDNA deletions, increased lactate levels or defective mitochondrial activities did not differ between the groups. In addition, each analysis taken in isolation contributed only partially to the diagnosis because of insufficient sensitivity and/or specificity.

When combination of mitochondrial investigations was considered, altered muscle histochemistry with multiple mtDNA deletions in muscle were more frequent in *POLG*^{+/+} patients (89% vs 43% in *POLG*^{-/-} patients, $p<0.001$). They however had insufficient specificity (57%) for diagnosis purposes.

Brain imaging

Brain MRI was normal in 35% of *POLG*^{+/+} patients and in 28% of *POLG*^{-/-} ones ($p=0.571$). The abnormalities that were observed are summarized in Table 3 and typical aspects are shown in Figure 2. The most frequent abnormalities were parenchymal hyperintensities with a bilateral, symmetrical topography (37%) (Figure 2A, B, C and D), followed by cerebellar (35%), subcortical (25%), brainstem (15%) and corpus callosum (13%) atrophy. Their frequency did not significantly differ among patients groups. None had sufficient sensitivity to significantly contribute to diagnosis. Age at onset and clinical phenotype did not differ between *POLG*^{+/+} patients with normal ($n=7$) and abnormal ($n=12$) brain imaging.

Electroneuromyography

Abnormal nerve conduction was constant in the *POLG*^{+/+} group (100% vs 55% in the *POLG*^{-/-} group, $p<0.001$) (Table 4) but a demyelinating neuropathy was never observed in *POLG*^{+/+} patients. Among the patients with neuropathy only sensory neuronopathy was significantly more frequent in *POLG*^{+/+} patients (63% with sensory neuronopathy vs 23% *POLG*^{-/-} ones, $p<0.001$) and had both high sensitivity and specificity. The features of the sensory neuronopathy (decreased or abolished pallesthesia, altered reflexes) were similar in *POLG*^{+/+}

and $POLG^{-/-}$ patients. $POLG^{+/+}$ patients neuropathy only differed from that of $POLG^{-/-}$ patients by its more frequent association with ptosis, ophthalmoplegia, dysphagia, axial and limb muscle weakness, movement disorders and psychiatric symptoms (chi2 comparison using Holm-Bonferroni correction).

Disease evolution of the patients with recessive $POLG$ mutations

The progression of signs was established for all $POLG^{+/+}$ patients by collection of the data from their clinical charts (Figure 3). With age, muscle weakness became more frequent and progressively involved more muscle territories. It essentially started with ocular muscles, which were defective in roughly 20% of the patients by 30 years of age and in 70% of the patients by 50 years of age. Pharyngeal, axial and limb muscles were progressively affected, with a time lag of several years. Neurological signs had a slightly earlier onset than muscle signs. Initial neurological presentations most often included sensory neuropathy, cerebellar syndrome and movement disorders. They were later followed by psychiatric symptoms, cognitive disabilities and hypoacusia. Epilepsy started early and its frequency rapidly increased, reaching 14% by 28 years of age. Only one additional patient presented with epilepsy at 54 years of age.

The widespread neuromuscular involvement was often present since the onset of the $POLG$ -related disease. It progressively became obvious with highly significant association of multiple signs in the $POLG^{+/+}$ patients. At the time of diagnosis, i.e. mean age of 50 years old in the present series, none of the $POLG^{+/+}$ patients presented with less than three associated signs while this was the case for 23% of the $POLG^{-/-}$ patients (p=0.005).

Of the eight adult patients reported as deceased during the study, six had recessive $POLG$ mutations. They died at 21, 25, 40, 48, 67 and 79 years of age. One died during status epilepticus at 21 years of age, one committed suicide at 25 years of age, three presented with

dementia and died at 40, 67 and 79 years of age. The cause of death of the sixth patient at 48 years of age is unknown, he presented with cerebellar syndrome, neuropathy and dysphagia.

DISCUSSION

In our study we aimed at delineating the specificity and/or sensitivity of the signs of *POLG*-related diseases. To avoid disputable causal relationship, we excluded *POLG*^{+/-} patients from the analysis of clinical phenotype, brain imaging, electrophysiological studies, and mitochondrial investigations. Our results have to be interpreted taking into account the essentially adult recruitment of our diagnostic centre. Epilepsy in particular appeared much less frequent in our cohort than in those with a higher proportion of paediatric cases.[3, 8, 21, 22] When present, epilepsy occurred before 25 years of age with only one exception. It could be extremely severe leading in one case to death during status epilepticus.

One main finding was that isolated clinical sign/symptom or investigation lacked either sufficient specificity or sensitivity to efficiently contribute to diagnosis. Limited horizontal and vertical gaze was very frequent, being present in 28 *POLG*^{+/+} patients. Among the six remaining patients two had only saccadic pursuit without ophthalmoplegia, one patient had unilateral ptosis and three had normal eye movements and no ptosis. The limited gaze and pursuit abnormalities could be due to nuclear or supranuclear impairment, but cannot be considered as ocular myopathy.. However two had no ptosis. Sensory neuropathy, a hallmark of *POLG*-related diseases,[6, 16, 21, 28-33] was present in 94% of the patients but electroneuromyography, performed in 88% of the *POLG*^{+/+} patients, disclosed constant sensory neuropathy. In addition it disclosed sensory neuronopathy in two third of the patients further suggesting *POLG* mutations. Electroneuromyography thus brought essential contribution to diagnosis. By contrast brain imaging was not directly informative for the diagnosis of *POLG*-related disease. Cerebellar hemispheric white matter hyperintensities,

previously associated with *POLG*-related diseases,[31, 33] were found in only four patients. Of note they may also be encountered with single mtDNA deletion.[34]

Evaluation of the diagnostic contribution of each mitochondrial investigation was partly hampered by incomplete population coverage. Lactatemia was elevated in 58% of the *POLG*^{+/+} patients but only 12 of them (35%) had lactate evaluation thus hampering proper comparison with *POLG*^{+/+} patients. Conversely, mitochondrial enzymatic assays were clearly not contributory with two third of *POLG*^{+/+} patients showing normal activities. Histological analyses of muscle and search for mtDNA multiple deletions, both largely performed and more frequently abnormal in *POLG*^{+/+} patients, were useful for the diagnosis. However, they did not point towards *POLG*-related diseases but towards mtDNA alterations as a whole, as shown by their low specificity. Indeed, among the 16 *POLG*^{-/-} patients with molecular diagnosis, 75% were found to have a mtDNA-related disease with deleterious mutations either in the mtDNA (six patients), *PEO1* gene encoding a mtDNA helicase (four patients), *TK2* gene encoding the mitochondrial thymidine kinase (one patient) or *OPA1* encoding a mitochondrial dynamin with influence on mtDNA maintenance (one patient).[35]

Our second finding was that *POLG*-related diseases are characterized by the widespread involvement of muscle and several neurological systems, often present since disease onset and becoming progressively more obvious with age. Diverse associations of sensory neuropathy, muscle weakness involving ocular, pharyngeal, axial and/or limb muscles, movement disorders, cerebellar syndrome, psychiatric symptoms and/or hypoacusia were highly suggestive of *POLG*-related diseases. On the other hand the likelihood of a *POLG*-related disease appeared low in the presence of isolated signs, even when typical signs like sensory neuronopathy were present. That likelihood further decreased with increasing age of the patients.

Recognition of the pattern of *POLG*-related phenotypes allowed us to evaluate the likelihood of a positive diagnosis for the 10 *POLG*^{+/−} patients. The phenotype of six patients, including the two with recognized dominant deleterious mutations, associated multiple neurological signs very similar to those observed with recessive mutations. Conversely for four patients (mutation p.Gly268Ala, p.Leu392Trp, p.Gly848Ser and p.Pro1073Leu), the lack of typical signs association and the presence of atypical signs (demyelinating neuropathy and pyramidal syndrome) prompted us to consider the disease to unlikely be *POLG*-related.

In conclusion we propose a diagnostic flowchart for *POLG*-related diseases essentially based on clinical signs and electroneuromyography with an indication for mitochondrial investigations in pauci-symptomatic patients (Figure 4). Indeed the direct sequencing of a highly variable gene such as *POLG* may be uninformative in the absence of such a diagnostic flowchart, especially when finding *POLG* variants of unknown significance.

Table 1 Clinical features encountered in patients suspected to have a *POLG*-related disease

	<i>POLG</i> ^{-/-} (n=110)	<i>POLG</i> ^{+/+} (n=34)	<i>POLG</i> ^{+/-} (n=10)	Sensitivity /specificity
Gender (M/F)	58/52	23/11	6/4	
Age at onset	29±21 (0.1-68)	31±17 (2-61)	21±20 (1-51)	
Disease duration	20±16 (0.5-71)	19±11 (4-51)	26±13 (7-42)	
Clinical neuropathy (66%)	65 (59%)	32 (94%)	5 (50%)	94%/41%
- Decreased/abolished reflexes	43	29	5	
- Decreased/abolished vibration sense	58	29	5	
Cerebellar impairment (60%)	64 (58%)	23 (65%)	5 (60%)	65%/42%
- Ataxia	61	22	5	
- Dysmetria/tremor	50	13	5	
- Dysarthria	36	12	4	
- Nystagmus	25	3	1	
Ptosis (45%)	35 (32%)	28 (80%)	6 (67%)	80%/68%
- Without ophthalmoplegia	12	2	2	
Ophthalmoplegia (45%)	36 (33%)	28 (83%)	5 (44%)	83%/67%
- Without ptosis	13	2	1	
No ptosis nor ophthalmoplegia	62 (56%)	4 (12%)	3 (30%)	
Movement disorders (41%)	40 (36%)	18 (53%)	5 (50%)	53%/64%
- Myoclonus	17	10	3	
- Dystonia	12	1	0	
- Tremor (action/attitude)	13	4	1	

- Chorea	0	4	1	
- Hypokinesia	9	2	3	
Muscle Weakness (32%)	28 (25%)	19 (54%)	3 (33%)	54%/75%
- Axial (neck/facial)	10	14	2	
- Limb	24	18	3	
Cognitive impairment (32%)	33 (30%)	11 (32%)	5 (50%)	32%/70%
- Mental retardation	6	1	2	
- Executive dysfunction	21	8	2	
- Dementia	6	3	1	
Pyramidal impairment (26%)	35 (32%)	4 (11%)	1 (11%)	11%/68%
- Plantar reflex extensor	35	4	1	
- Unilateral	8	4	0	
- Bilateral	23	0	1	
- Increased UL and LL reflexes	12	0	1	
- LL spasticity	4	0	1	
Dysphagia (26%)	19 (17%)	20 (57%)	1 (11%)	57%/83%
Hypoacusia (23%)	20 (18%)	10 (39%)	5 (50%)	39%/82%
Psychiatric symptoms (21%)	12 (11%)	14 (41%)	6 (60%)	41%/89%
- Anxiety	10	3	2	
- Depression	10	10	5	
- Psychosis	2	4	2	
Epilepsy (14%)	14 (13%)	6 (17%)	1 (11%)	17%/87%

The frequency of the signs is indicated between brackets in the first column for the whole patients' population and between brackets after the patient number for each patients group.

The sensitivity of the diverse signs is defined as the % of $POLG^{+/+}$ patients with the

sign/symptom; the specificity as the % of *POLG*^{-/-} patients without the sign/symptom;

LL=lower limbs; UL=upper limbs

Confidential: For Review Only

Table 2: Mitochondrial investigations in patients suspected to have a *POLG*-related disease

	<i>POLG</i> ^{-/-}	<i>POLG</i> ^{+/+}	<i>POLG</i> ^{+/-}	Sensitivity /specificity
Muscle histology	78 (71%)	28 (82%)	9 (90%)	96%/32%
- RRF	37	27	6	
- COX-	43	25	6	
- Both RRF and COX-	32	25	5	
- Normal histology	25	1	2	
Lactate measurement	52 (47%)	12 (35%)	5 (50%)	58%/58%
- High lactate	22	7	4	
- Normal lactate	30	5	1	
Mitochondrial assays	50 (45%)	21 (62%)	6 (60%)	33%/64%
- Isolated complex	10	5	1	
- Combined defects	8	2	2	
- Normal	32	14	3	
Long range PCR	68 (62%)	20 (59%)	6 (60%)	85%/40%
- Abnormal pattern	41	17	4	
- Normal pattern	27	3	2	

The frequency of investigations was similar in the patients groups ($p=0.444$ for lactate measurement, $p=0.209$ for muscle histology, $p=0.203$ for enzymatic assays in muscle and $p=0.905$ for search for mtDNA deletions); RRF= Ragged Red muscle Fibers; COX- Cytochrome c oxidase defective muscle fibers; High lactate = blood lactate above 1.8 mM in the fasting state; abnormal pattern in long range PCR most often consisted in the presence of additional multiple bands below the band at the expected normal size, in rare occurrence only one

additional band could be observed and/or the normal size band could be decreased or absent.

The sensitivity is defined as the % of *POLG*^{+/+} patients with abnormal investigation and the specificity as the % of *POLG*^{-/-} patients with normal investigation.

Table 3: Brain imaging in patients suspected to have a *POLG*-related disease

	<i>POLG</i> ^{-/-} (n=43)	<i>POLG</i> ^{+/+} (n=20)	<i>POLG</i> ^{+/-} (n=5)
Normal brain imaging	12	7	0
Abnormal brain imaging	31	13	5
Atrophy			
Cerebellar	15	6	3
Brainstem	7	2	1
Corpus callosum	5	2	2
Subcortical	11	4	2
Cortical	4	1	1
Signal Abnormalities			
<u>Bilateral, symmetrical HS</u>	<u>15</u>	<u>7</u>	<u>3</u>
Cerebellar peduncles	3	2	0
Cerebellar hemispheric WM	1	4	0
Dentate nuclei	4	0	2
Brainstem pyramidal Tract	2	1	0
Brainstem Lemniscus	3	3	0
Basal ganglia	0	0	1
Cerebral WM	6	2	2
<u>ARWMC</u>	<u>8</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
<u>MS like pattern</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>

The frequency of brain imaging was similar between groups (39%, 59% and 50% of the *POLG*^{-/-}, *POLG*^{+/+} and *POLG*^{+/-} patients respectively, p=0.119). Age at brain imaging did not differ between groups (51±17, 51±15 and 50±13 years for *POLG*^{-/-}, *POLG*^{+/+} and *POLG*^{+/-}

groups respectively). HS=hyperintensities, WM=white matter, ARWMC=age-related white matter changes;[36-39] MS-like pattern=multifocal signals as small, bright lesions in the watershed regions.[36-39] In addition, one patient of the *POLG*^{+/+} group presented with a large occipital hyperintensity followed by local progressive atrophy while one patient in the *POLG*^{-/-} group presented with focal cortical dysplasia and another one with brainstem linear, thin, parallel hypointensities similar to those encountered in the autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix Saguenay.[40]

Table 4: Electroneuromyographical analyses in patients suspected to have a *POLG*-related disease

	<i>POLG</i> ^{-/-} (n=80)	<i>POLG</i> ^{+/+} (n=30)	<i>POLG</i> ^{+/-} (n=5)	Sensitivity /specificity
Normal	36	0	1	
Abnormal	44	30	4	100%/45%
Sensory Neuronopathy	18	19	3	63%/78%
Sensory Axonal Neuropathy	18	10	0	33%/78%
Sensorimotor Polyneuropathy	8	1	1	3%/90%
Axonal	6	1	0	3%/93%
Demyelinating	2	0	1	0%/98%
Isolated Myopathy	2	0	0	0%/98%

The frequency of EMG analysis did not differ in the three patients groups ($p=0.121$). Sensory neuronopathy was defined by the markedly reduced or abolished sensory nerve action potentials in lower limbs and most often upper limbs, sensory axonal neuropathy by their moderate reduction in lower limbs, and sensorimotor polyneuropathy by the presence of reduced compound motor action and sensory nerve action potentials.[41] Axonal forms could display moderately reduced conduction velocities but F-wave latencies were always normal. Demyelinating neuropathies presented with severely prolonged F wave latencies and decreased nerve conduction. Myopathy was defined as the presence of short duration, low amplitude motor units with recruitment of muscle activity (spontaneous, during weak and maximal voluntary contraction). A myopathic pattern was very rarely observed, either in isolation (two patients in the *POLG*^{-/-} group or in association with neuropathy, one patient in the *POLG*^{-/-} group and two patients in the *POLG*^{+/+} group).

Acknowledgements

The authors wish to thank Isabelle Lemièrre and Sandrine Filaut for their excellent technical help and Dr Odile Dubourg for sharing information on her patients.

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure:

Dr Maya Tchikviladzé received travel grants from Merck-Serono, Sanofi-Aventis, Novartis and Teva.

Dr Mylène Gilleron reports no disclosure.

Dr Thierry Maisonobe reports no disclosure.

Dr Damien Galanaud reports no disclosure.

Dr Pascal Laforêt received research grant, honoraria, and travel funding from the Genzyme Corporation and is a member of the Genzyme Pompe Disease Advisory Board.

Dr Alexandra Durr received honoraria from the Wolfson Foundation for reviewing the scientific project

Dr Bruno Eymard received honoraria from LFB (Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies) and Biomarin

Dr Fanny Mochel received research grants from Inserm, Ipsen and Ultragenyx pharmaceutical.

Dr Hélène Ogier reports no disclosure

Dr Anthony Béhin received honoraria and travel grants from Genzyme

Dr Tanya Stojkovic received honoraria from LFB (Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies)

Dr Bertrand Degos received funding from Novartis and Ipsen for travel and accommodation in medical meetings

Dr Isabelle Gourfinkel-An reports no disclosure.

Dr Frederic Sedel received hononaria from “Actelion pharmaceuticals” for symposia, advisory boards and consultancy. He received hononaria from “Orphan Europe Recordati” for expertise and for participation to the “Orphan Europe Academy”. He is co-founder and scientific advisor for « medDay pharmaceuticals ».

Dr Mathieu Anheim received honoraria and travel grants from Actelion, Novartis and Teva

Dr Alexis Elbaz has received research funding from ANR (Agence Nationale de la Recherche).

Dr Karine Viala reports no disclosure

Dr Marie Vidailhet reports no disclosure

Dr Alexis Brice received honoraria from the Wolfson Foundation for reviewing the scientific project

Dr Claude Jardel reports no disclosure.

Dr Anne Lombès received grants from the ANR (Agence Nationale pour la Recherche) [grant numbers ANR MNP 2008 Mitopark: ANR-08-MNPS-020-01); from the Association Française contre les Myopathies (AFM) and Association contre les Maladies Mitochondriales (AMMi)

Funding: This work was supported by grants from the FRM (Fondation pour la Recherche Médicale); from the Association Française contre les Myopathies (AFM) and Association contre les Maladies Mitochondriales (AMMi) to AL

The research leading to these results has received funding from the program “Investissements d’avenir” ANR-10-IAIHU-06.

REFERENCES

1. Van Goethem G, Dermaut B, Lofgren A *et al.*: Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 2001, **28**(3):211-212.

2. Naviaux RK, Nguyen KV: POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol* 2004, **55**(5):706-712.

3. Tang S, Wang J, Lee NC *et al.*: Mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: an ever expanding molecular and clinical spectrum. *J Med Genet* 2011, **48**(10):669-681.

4. Tzoulis C, Engelsens BA, Telstad W *et al.*: The spectrum of clinical disease caused by the A467T and W748S POLG mutations: a study of 26 cases. *Brain* 2006, **129**(Pt 7):1685-1692.

5. Hakonen AH, Heiskanen S, Juvonen V *et al.*: Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am J Hum Genet* 2005, **77**(3):430-441.

6. Van Goethem G, Martin JJ, Dermaut B *et al.*: Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 2003, **13**(2):133-142.

7. Schulte C, Synofzik M, Gasser T *et al.*: Ataxia with ophthalmoplegia or sensory neuropathy is frequently caused by POLG mutations. *Neurology* 2009, **73**(11):898-900.

8. Wong LJ, Naviaux RK, Brunetti-Pierri N *et al.*: Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations. *Hum Mutat* 2008, **29**(9):E150-172.

9. Deschauer M, Tennant S, Rokicka A *et al.*: MELAS associated with mutations in the POLG1 gene. *Neurology* 2007, **68**(20):1741-1742.
10. Van Goethem G, Schwartz M, Lofgren A *et al.*: Novel POLG mutations in progressive external ophthalmoplegia mimicking mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Eur J Hum Genet* 2003, **11**(7):547-549.
11. Amiot A, Tchikviladze M, Joly F *et al.*: Frequency of mitochondrial defects in patients with chronic intestinal pseudo-obstruction. *Gastroenterology* 2009, **137**(1):101-109.
12. Engelsens BA, Tzoulis C, Karlsen B *et al.*: POLG1 mutations cause a syndromic epilepsy with occipital lobe predilection. *Brain* 2008, **131**(Pt 3):818-828.
13. Uusimaa J, Gowda V, McShane A *et al.*: Prospective study of POLG mutations presenting in children with intractable epilepsy-prevalence and clinical features. *Epilepsia* 2013.
14. Harrower T, Stewart JD, Hudson G *et al.*: POLG1 mutations manifesting as autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Arch Neurol* 2008, **65**(1):133-136.
15. Pitceathly RD, Tomlinson SE, Hargreaves I *et al.*: Distal myopathy with cachexia: an unrecognised phenotype caused by dominantly-inherited mitochondrial polymerase gamma mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012, **84**(1):107-110.
16. Lax NZ, Whittaker RG, Hepplewhite PD *et al.*: Sensory neuronopathy in patients harbouring recessive polymerase gamma mutations. *Brain* 2012, **135**(Pt 1):62-71.

17. Camdessanche JP, Jousserand G, Franques J *et al.*: A clinical pattern-based etiological diagnostic strategy for sensory neuropathies: a French collaborative study. *J Peripher Nerv Syst* 2012, **17**(3):331-340.

18. Dubowitz V, Brooke MH: **Muscle biopsy: a modern approach**. Philadelphia:: W.B. Saunders Compagny; 1973.

19. Medja F, Allouche S, Frachon P *et al.*: Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 2009, **9**(5):331-339.

20. Auré K, Ogier de Baulny H, Laforet P *et al.*: Chronic progressive ophthalmoplegia with large-scale mtDNA rearrangement: can we predict progression? *Brain* 2007, **130**:1516-1524.

21. Horvath R, Hudson G, Ferrari G *et al.*: Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain* 2006, **129**(Pt 7):1674-1684.

22. Blok MJ, van den Bosch BJ, Jongen E *et al.*: The unfolding clinical spectrum of POLG mutations. *J Med Genet* 2009, **46**(11):776-785.

23. Stumpf JD, Saneto RP, Copeland WC: Clinical and molecular features of POLG-related mitochondrial disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013, **5**(4):a011395.

24. Sarzi E, Bourdon A, Chretien D *et al.*: Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J Pediatr* 2007, **150**(5):531-534, 534 e531-536.

25. Hopkins SE, Somoza A, Gilbert DL: Rare autosomal dominant POLG1 mutation in a family with metabolic strokes, posterior column spinal degeneration, and multi-endocrine disease. *J Child Neurol* 2010, **25**(6):752-756.

26. Bolszak M, Anttonen AK, Komulainen T *et al.*: Digenic mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsy Res* 2009, **85**(2-3):300-304.
27. Kasiviswanathan R, Copeland WC: Biochemical analysis of the G517V POLG variant reveals wild-type like activity. *Mitochondrion* 2011, **11**(6):929-934.
28. Fadic R, Russel JA, Vedanarayanan VV *et al.*: Sensory ataxic neuropathy as the presenting feature of a novel mitochondrial disease. *Neurology* 1997, **49**:239-245.
29. Winterthun S, Ferrari G, He L *et al.*: Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations. *Neurology* 2005, **64**:1204-1208.
30. Gago MF, Rosas MJ, Guimaraes J *et al.*: SANDO: two novel mutations in POLG1 gene. *Neuromuscul Disord* 2006, **16**(8):507-509.
31. Tzoulis C, Neckelmann G, Mork SJ *et al.*: Localized cerebral energy failure in DNA polymerase gamma-associated encephalopathy syndromes. *Brain* 2010, **133**(Pt 5):1428-1437.
32. Schicks J, Synofzik M, Schulte C *et al.*: POLG, but not PEO1, is a frequent cause of cerebellar ataxia in Central Europe. *Mov Disord* 2010, **25**(15):2678-2682.
33. Synofzik M, Srulijes K, Godau J *et al.*: Characterizing POLG ataxia: clinics, electrophysiology and imaging. *Cerebellum* 2012, **11**(4):1002-1011.
34. Serrano M, Garcia-Silva MT, Martin-Hernandez E *et al.*: Kearns-Sayre syndrome: cerebral folate deficiency, MRI findings and new cerebrospinal fluid biochemical features. *Mitochondrion* 2010, **10**(5):429-432.
35. Yu-Wai-Man P, Sitarz KS, Samuels DC *et al.*: OPA1 mutations cause cytochrome c oxidase deficiency due to loss of wild-type mtDNA molecules. *Hum Mol Genet* 2010, **19**(15):3043-3052.

36. Wahlund LO, Barkhof F, Fazekas F *et al.*: A new rating scale for age-related white matter changes applicable to MRI and CT. *Stroke* 2001, **32**(6):1318-1322.

37. Fazekas F, Barkhof F, Wahlund LO *et al.*: CT and MRI rating of white matter lesions. *Cerebrovasc Dis* 2002, **13 Suppl 2**:31-36.

38. Barkhof F, Filippi M, Miller DH *et al.*: Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 1997, **120 (Pt 11)**:2059-2069.

39. Barkhof F, Scheltens P: Imaging of white matter lesions. *Cerebrovasc Dis* 2002, **13 Suppl 2**:21-30.

40. Synofzik M, Soehn AS, Gburek-Augustat J *et al.*: Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix Saguenay (ARSACS): expanding the genetic, clinical and imaging spectrum. *Orphanet J Rare Dis* 2013, **8**:41.

41. Camdessanche JP, Jousserand G, Ferraud K *et al.*: The pattern and diagnostic criteria of sensory neuronopathy: a case-control study. *Brain* 2009, **132**(Pt 7):1723-1733.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Association of signs in patients with or without *POLG* mutations

The presence of either ptosis, ophthalmoplegia, peripheral neuropathy, psychiatric symptoms, cognitive disabilities, axial muscle weakness, limb muscle weakness, pyramidal syndrome, dysphagia, movement disorders, cerebellar syndrome, hypoacusia, epilepsy or cataract was counted as one sign. All signs present in one patient were then added to give the number of associated signs per patient. The results were then expressed as the proportion of patients with a given number of associated signs in the *POLG*^{+/+} (Black bars) or *POLG*^{-/-} (grey bars) group; the number of associated signs/patient was higher in *POLG*^{+/+} than in *POLG*^{-/-} patients ($p < 0.001$).

Figure 2: Brain imaging of patients with *POLG* mutations

The different aspects encountered in patients with *POLG*-related diseases are shown. A) Axial T2 weighted scan showing symmetrical hyperintensities of cerebellar peduncles, B) Axial FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery) scan showing symmetrical hypersintensities in the brainstem pyramidal tract and in the cerebellar hemispheric white matter; C) Axial FLAIR scan showing symmetrical hyperintensities of optical radiations; D) Axial T2 weighed scan showing symmetrical hyperintensities in the brainstem lemniscus; A, B, D: Patient with p.Ala143Val in *trans* with p.Trp748Ser; C, Patient with p.Ala467Thr in *trans* with p.Met919Thr.

Figure 3: Natural history of diseases due to recessive *POLG* mutations

Upper graph: frequency of the main muscle signs; mean age at onset and mean age at diagnosis are indicated with vertical dotted lines; lower graph: frequency of the main neurological signs associated with disease due to recessive *POLG* mutations; cerebellar S=cerebellar syndrome; mvt disorder= movement disorder; psy = psychiatric symptoms; cognitive def= cognitive defect.

Figure 4: Diagnostic flowchart of adult *POLG*-related diseases

The presence of more than three different clinical signs and the absence of pyramidal involvement is sufficient to directly perform *POLG* sequencing. If mutations are not clearly deleterious, mitochondrial investigations should be performed to try and demonstrate the presence of mitochondrial dysfunction with accumulation of multiple mtDNA deletions and histochemical anomalies with scattered muscle fibres with cytochrome c oxidase (COX) defect and mitochondrial accumulation with succinate dehydrogenase (SDH) stain. If less than three clinical signs are observed, electroneuromyography (EMG), if not previously obtained, is mandatory to identify axonal sensory neuropathy. If neuropathy is absent, then mitochondrial investigations should be performed. The likelihood of *POLG*-related disease is very small without sensory neuropathy in patients above 50 years of age.

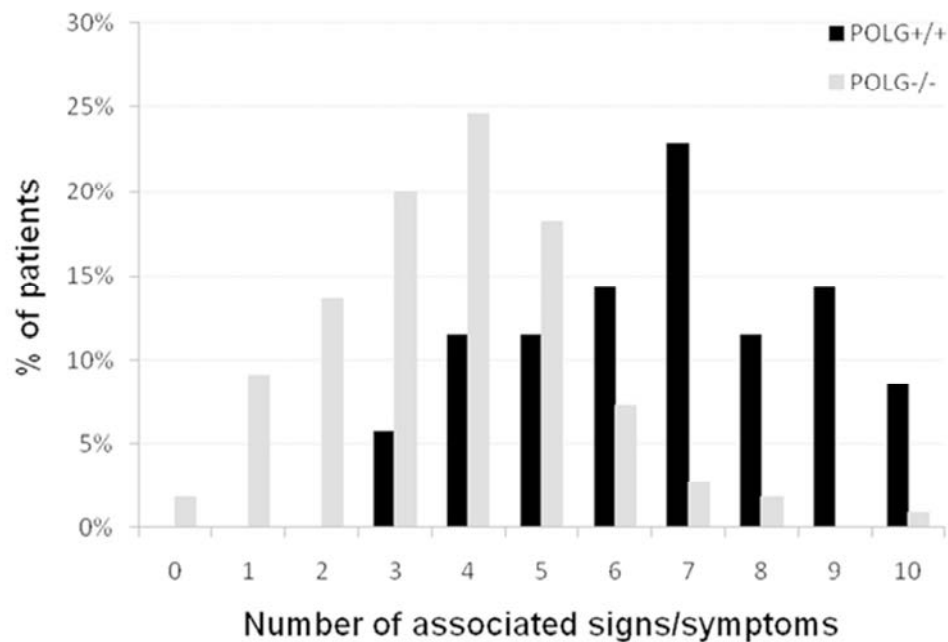


Figure 1: Association of signs in patients with or without POLG mutations

The presence of either ptosis, ophthalmoplegia, peripheral neuropathy, psychiatric symptoms, cognitive disabilities, axial muscle weakness, limb muscle weakness, pyramidal syndrome, dysphagia, movement disorders, cerebellar syndrome, hypoacusia, epilepsy or cataract was counted as one sign. All signs present in one patient were then added to give the number of associated signs per patient. The results were then expressed as the proportion of patients with a given number of associated signs in the POLG+/+ (Black bars) or POLG-/- (grey bars) group; the number of associated signs/patient was higher in POLG+/+ than in POLG-/- patients ($p < 0.001$).

54x37mm (300 x 300 DPI)

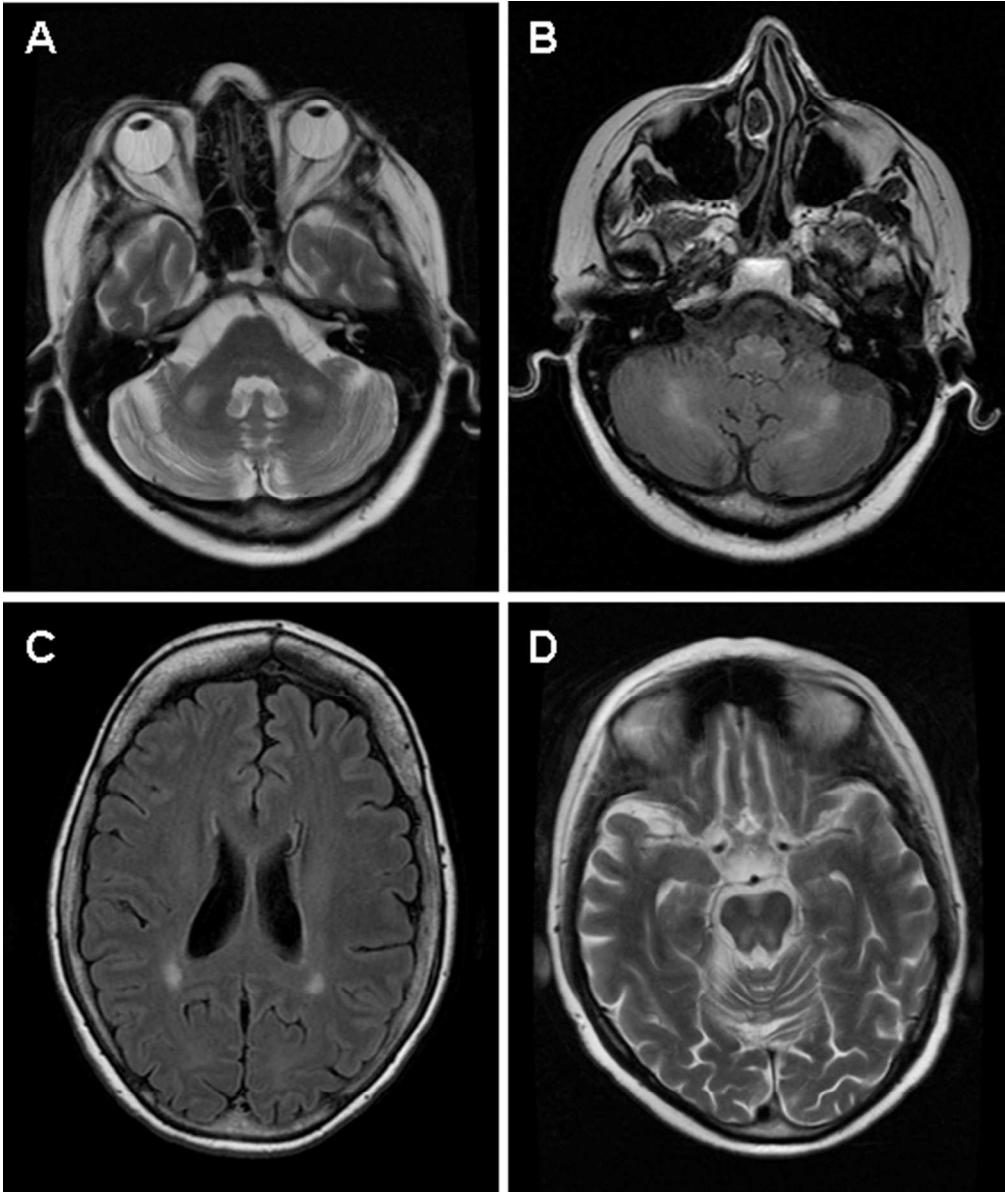


Figure 2: Brain imaging of patients with POLG mutations
The different aspects encountered in patients with POLG-related diseases are shown. A) Axial T2 weighted scan showing symmetrical hyperintensities of cerebellar peduncles, B) Axial FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery) scan showing symmetrical hypersintensities in the brainstem pyramidal tract and in the cerebellar hemispheric white matter; C) Axial FLAIR scan showing symmetrical hyperintensities of optical radiations; D) Axial T2 weighed scan showing symmetrical hyperintensities in the brainstem lemniscus; A, B, D: Patient with p.Ala143Val in trans with p.Trp748Ser; C, Patient with p.Ala467Thr in trans with p.Met919Thr.
95x113mm (300 x 300 DPI)

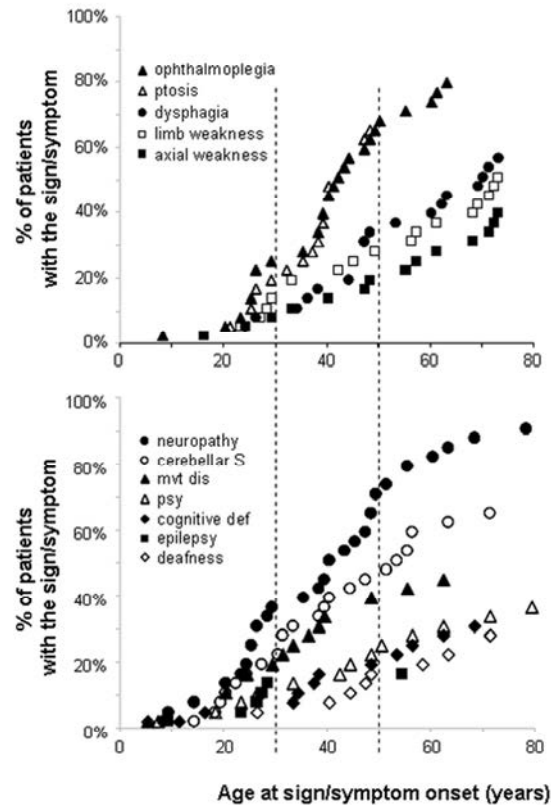
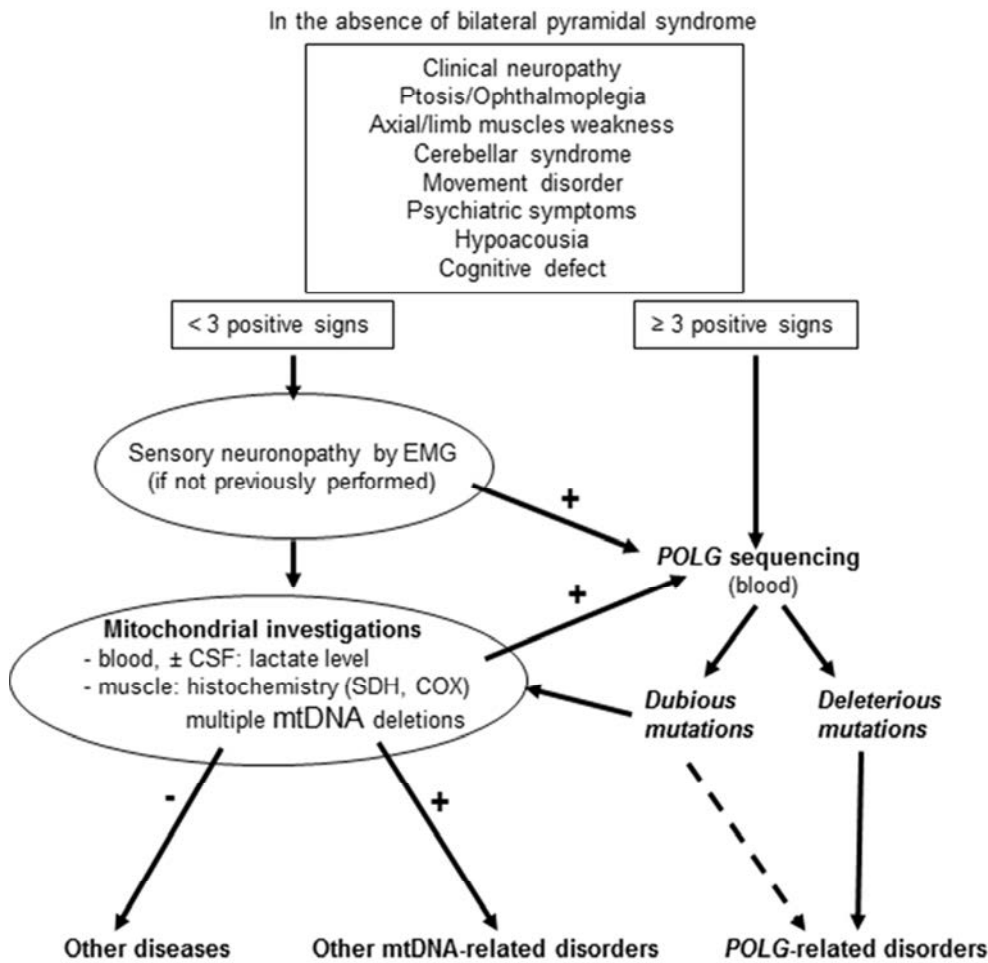


Figure 3: Natural history of diseases due to recessive POLG mutations
 Upper graph: frequency of the main muscle signs; mean age at onset and mean age at diagnosis are indicated with vertical dotted lines; lower graph: frequency of the main neurological signs/symptoms associated with disease due to recessive POLG mutations; cerebellar S=cerebellar syndrome; mvt disorder= movement disorder; psy = psychiatric symptoms; cognitive def= cognitive defect.
 53x80mm (300 x 300 DPI)



Diagnostic flowchart of adult POLG-related diseases

The presence of more than three different clinical signs and the absence of pyramidal involvement is sufficient to directly perform POLG sequencing. If mutations are not clearly deleterious, mitochondrial investigations should be performed to try and demonstrate the presence of mitochondrial dysfunction with accumulation of multiple mtDNA deletions and histochemical anomalies with scattered muscle fibres with cytochrome c oxidase (COX) defect and mitochondrial accumulation with succinate dehydrogenase (SDH) stain.

If less than three clinical signs are observed, electroneuromyography (EMG), if not previously obtained, is mandatory to identify sensory neuropathy. If neuropathy is absent, then mitochondrial investigations should be performed. The likelihood of POLG-related disease is very small without sensory neuropathy in patients above 50 years of age

78x76mm (300 x 300 DPI)

Table e-1: *POLG* mutations found in our patient population

Mutation	Prediction	Literature	Mutation associations	Frequency
c.235C>T p.Leu79Phe	1/1/0/1 (3)	NA	trans with Met299Leu	1 (2/1)
c.264C>G p.Phe88Leu	0/1/0/1 (2)	discussed	trans with Trp748Ser,	2 (2/2)
c.428C>T p.Ala143Val	1/1/0/1 (3)	deleterious	trans with Trp748Ser	1 (2/1)
c.803G>C p.Gly268Ala	1/1/0/1 (3)	discussed	only mutation	1 (1/1)
c.895A>C p.Met299Leu	0/0/0/1 (1)	NA	trans with Leu79Phe	1 (2/1)
c.911T>G p.Leu304Arg	1/1/1/1 (4)	deleterious	trans with Pro587Leu, Trp748Ser	2 (3/2)
c.925C>T p.Arg309Cys	1/1/1/1 (4)	NA*	hmz	2 (2/1)
c.1094G>C p.Gly365Ala	1/0/0/1 (2)	NA	only mutation	1 (1/1)
c.1174C>G p.Leu392Val	1/1/0/1 (3)	discussed	only mutation	1 (1/1)
c.1190C>T p.Leu397Val	1/0/0/1 (2)	NA	trans with Val855Ala**	1 (1/1)
c.1252T>C p.Cys418Arg	1/1/0/1 (3)	deleterious	trans with, Pro587Leu	1 (1/1)

c.1399G>A p.Ala467Thr	1/0/0/1 (2)	deleterious	hmz (x3)**, trans with, Leu559Pro(x2), Pro587Leu, Pro648Arg, Trp748Ser (x3), Met919Thr	14 (14/12)
c.1459G>T p.Asp487Tyr	1/1/0/1 (3)	NA	trans with Trp748Ser	1 (1/1)
c.1550G>T p.Gly517Val	0/0/0/0 (0)	discussed	hmz	2 (4/2)
c.1676T>C p.Leu559Pro	1/1/0/1 (3)	NA	trans with Ala467Thr(x2)	2 (4/1)
c.1760C>T p.Pro587Leu	1/0/0/1 (2)	deleterious	Always in cis with Thr251Ile hmz, trans with Leu304Arg, Cys418Arg, Ala467Thr, Gly848Ser, Glu856Lys (x2)	8 (14/8)
c.1943C>G p.Pro648Arg	1/0/0/1 (2)	deleterious	trans with Ala467Thr, Arg1096Cys	2 (2/2)
c.2243G>C p.Trp748Ser	1/0/0/1 (2)	deleterious	hmz (x3), trans with Phe88Leu, Ala143Val, Leu304Arg, Ala467Thr (x3), Asp487Tyr, Gly757Asp, Gly848Ser	15 (27/14)
c.2270G>A p.Gly757Asp	1/1/1/1 (4)	NA	trans with Trp748Ser	1 (1/1)

c.2542G>A p.Gly848Ser	1/1/1/1 (4)	deleterious	trans with Pro587Leu, Trp748Ser, Arg953Cys, Arg953His, only mutation (x2)	6 (9/6)
c.2554C>T p.Arg852Cys	1/1/1/1 (4)	deleterious	trans with Ala889Thr	1 (2/2)
c.2564T>C p.Val855Ala	1/1/1/1 (4)	discussed	trans with Ala397Val**	1 (1/1)
c.2566G>A p.Glu856Lys	1/1/0/1 (3)	NA	trans with Pro587Leu (x2)	2 (2/1)
c.2665G>A p.Ala889Thr	1/1/1/1 (4)	discussed	trans with Arg852Cys	1 (1/1)
c.2756T>C p.Met919Thr	1/1/1/1 (4)	NA	trans with Ala467Thr	1 (1/1)
c.2828G>A p.Arg943His	1/1/1/1 (4)	deleterious	only mutation	1 (2/1)
c.2857C>T p.Arg953Cys	1/1/1/1 (4)	deleterious	trans with G848S	1 (1/1)
c.2858G>A p.Arg953His	1/1/1/1 (4)	NA*	trans with G848S	1 (1/1)
c.2864A>G p.Tyr955Cys	1/1/1/1 (4)	Deleterious	only mutation	1 (1/1)
c.3218C>T p.Pro1073Lys	1/1/1/1 (4)	Deleterious	only mutation**	1 (1/1)

c.3286C>T p.Arg1096Cys	0/1/1/1 (3)	Deleterious	trans with P648R	1 (2/2)
c.3529G>C p.Val1177Leu	1/0/0/1 (2)	NA	only mutation	1 (5/1)

Mutations are indicated as the nucleotide change followed by the aminoacid modification;
only potentially deleterious mutations are indicated in the table, all known polymorphisms
and intronic variants have been omitted, including mutation pTyr831Cys (observed in three
patients), which has been considered deleterious for a while but is now considered a
polymorphism, mutation p.Glu1143Gly (observed in four patients), which is considered a
modifying factor for pathogenic mutation but without deleterious consequences when found
in isolation,; Prediction=score of pathogenicity as given by four different prediction
softwares: Polyphen, SIFT, GVG D, and MT, using normalization of the results of each
software in only two categories: 1 for probably deleterious and 0 for polymorphism or
possibly deleterious mutations, the sum of the four scores is given between brackets;
Literature=status of the mutation in published reports with deleterious=mutations reported as
deleterious, discussed=mutations whose deleterious potential is still debated, NA=not
previously reported mutation; * mutation p.Arg309Cys has not been previously reported but
mutation p.Arg309Leu and p.Arg309His have been reported as deleterious, similarly mutation
p.Arg953His has not been previously reported but mutation p.Arg953Cys has been reported
as deleterious; Mutations associations=association of mutations in individual patients with
hmz=homozygous mutations, trans with=association with mutation affecting the other *POLG*
allele, cis with= association with mutation affecting the same *POLG* allele;
Frequency=observed frequency of the mutated allele in the reported patients population,
numbers given between brackets indicate the frequency in the total population analyzed in our

centre with the number of observations of the mutated allele (left side of the slash) and the number of independent families (right side of the slash, number in bold).

** patients already published : 1 patient with Ala397Val *in trans* with Val855Ala¹, 3 patients *hmz* with Ala467Thr², and 1 patient with *htz* Pro1073Lys (References : ¹ Degos B, Laforet P, Jardel C et al. POLG mutations associated with remitting/relapsing neurological events. J Clin Neurosci 2014;21(1):186-8 - ² Neeve VC, Samuels DC, Bindoff LA et al. What is influencing the phenotype of the common homozygous polymerase-gamma mutation p.Ala467Thr? Brain 2012;135:3614-3626 - ³ Rouzier C, Chaussenot A, Serre V *et al.*: Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments for the detection of large intragenic POLG rearrangements in a large French cohort. Eur J Hum Genet 2013;1-9)

Associations of *POLG* mutations in each *POLG*^{+/+} patient

Patient Number	<i>POLG</i> mutations	
	Allele 1	Allele 2
1	c.1399G>A (p.Ala467Thr)	c.2756T>C (p.Met919Thr)
2	c.911T>G (p.Leu304Arg)	c.752C>T (p.Thr251Ile) _ c.1759C>T (p.Pro587Leu)
3	c.2542G>A (p.Gly848Ser)	c.2857C>T (p.Arg953Cys)
4	c.1399G>A (p.Ala467Thr)	c.752C>T (p.Thr251Ile) _ c.1759C>T (p.Pro587Leu)
5	c.1399G>A (p.Ala467Thr)	c.1676T>C (p.Leu559Pro)

6	c.1760C>T (p.Pro587Leu) _ c.752C>T (p.Thr251Ile)	c.1760C>T (p.Pro587Leu) _ c.752C>T (p.Thr251Ile)
7	c.1190C>T (p.Ala397Val)	c.2564T>C (p.Val 855Ala)
8	c.1399G>A (p.Ala467Thr)	c.1399G>A (p.Ala467Thr)
9	c.1399G>A (p.Ala467Thr)	c.1943C>G (p.Pro648Ser)
10	c.264C>G (p.Phe88Leu)	c.2243G>C (p.Trp748Ser)
11	c.1943C>G (p.Pro648Arg)	c.3286C>T (p.Arg1096Cys)
12	c.1399G>A (p.Ala467Thr)	c.2243G>C (p.Trp748Ser)
13	c.2542G>A (p.Gly848Ser)	c.2858G>A (p.Arg953His)
14	c.925 C>T (p.Arg309Cys)	c.925 C>T (p.Arg309Cys)
15	c.428C>T (p.Ala143Val)	c.2243G>C (p.Trp748Ser)
16	c.2243G>C (p.Trp748Ser)	c.2270G>A (p.Gly757Ala)
17	c.1760C>T (p.Pro587Leu) _ c.752C>T (p.Thr251Ile)	c.2542G>A (p.Gly848Ser)
18	c.1399G>A (p.Ala467Thr)	c.1399G>A (p.Ala467Thr)
19	c.1399G>A (p.Ala467Thr)	c.2243G>C (p.Trp748Ser)
20	c.2554C>T (p.Arg852Cys)	c.2665G>A (p. Ala889Thr)
21	c.2243G>C (p.Trp748Ser)	c.2243G>C (p.Trp748Ser)

22	c.2243G>C (p.Trp748Ser)	c.2243G>C (p.Trp748Ser)
23	c.1252T>C (p.Cys418Arg)	c.1760C>T (p.Pro587Leu) _ c.752C>T (p.Thr251Ile)
24	c.911T>G (p.Leu304Arg)	c.2243G>C (p.Trp748Ser)
25	c.1459G>T (p.Asp487Tyr)	c.2243G>C (p.Trp748Ser)
26	c.1550G>T (p.Gly517Val)	c.1550G>T (p.Gly517Val)
27	c.1399G>A (p.Ala467Thr)	c.1399G>A (p.Ala467Thr)
28	c.2243G>C (p.Trp748Ser)	c.2542G>A (p.Gly848Ser)
29	c.752C>T (p.Thr251Ile) _ c.1759C>T (p.Pro587Leu)	c.2566G>A (p.Gly856Lys)
30	c.752C>T (p.Thr251Ile) _ c.1759C>T (p.Pro587Leu)	c.2566G>A (p.Gly856Lys)
31	c.1399G>A (p.Ala467Thr)	c.1676T>C (p.Leu559Pro)
32	c.1399G>A (p.Ala467Thr)	c.2243G>C (p.Trp748Ser)
33	c.235C>T (p.Leu79Phe)	c.895 A>C (p.Met229Leu)
34	c.2243G>C (p.Trp748Ser)	c.2243G>C (p.Trp748Ser)

Table e-2: Sensitivity/specificity of signs and symptoms associations in *POLG*-related diseases

	Cerebellar syndrome	Ptosis	Ophthalmoplegia	Movements disorders	Cognitive defects	Limb weakness	Pyramidal syndrome
Peripheral neuropathy	63%/60%*	74%/85%***	77%/85%***	51%/77%**	34%/82%	46%/85%***	11%/80%
Cerebellar syndrome		46%/85%***	49%/85%***	43%/72%	29%/78%	23%/88%	11%/75%
Ptosis			74%/79%***	43%/91%***	26%/95%***	46%/91%***	9%/92%
Ophthalmoplegia				46%/86%***	26%/94%**	49%/88%***	9%/92%
Movements disorders					23%/84%	29%/95%***	9%/85%
Cognitive defects						14%/95%	6%/87%
Limb weakness							11%/90%
Pyramidal syndrome							
Dysphagia							
Hypoacusia							
Psychiatric symptoms							
Axial weakness							
Epilepsy							

	Dysphagia	Hypoacusia	Psychiatric symptoms	Axial weakness	Epilepsy	Cataract
Peripheral neuropathy	54%/90%***	31%/87%*	37%/93%***	37%/96%***	14%/95%	9%/98%
Cerebellar syndrome	31%/90%**	17%/86%	37%/91%***	11%/97%	14%/91%	0%/99%
Ptosis	51%/94%***	26%/96%***	26%/97%***	40%/94%***	11%/98%*	9%/100%*
Ophthalmoplegia	51%/93%***	31%/97%***	31%/97%***	37%/94%***	14%/97%*	9%/99%
Movements disorders	26%/93%**	14%/93%	26%/95%***	14%/99%**	14%/93%	3%/100%
Cognitive defects	17%/95%	14%/96%	11%/96%	11%/100%**	6%/95%	6%/100%
Limb weakness	37%/96%***	20%/97%**	26%/98%***	37%/95%***	9%/98%	9%/98%
Pyramidal syndrome	9%/95%	6%/93%	6%/97%	11%/97%	0%/94%	0%/98%
Dysphagia		26%/95%***	34%/100%***	26%/96%***	6%/97%	9%/100%*
Hypoacusia			17%/96%*	11%/100%**	3%/97%	6%/99%
Psychiatric symptoms				14%/100%***	11%/97%	3%/99%
Axial weakness					3%/100%	9%/99%
Epilepsy						0%/100%

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

For each association the sensitivity (% of POLG^{+/+} patients with the association) is given on the left side of the slash and specificity (% of POLG^{-/-} patients without the association) on the right side of the slash. Numbers in bold show that the association occurred in different proportion of the POLG^{+/+} and POLG^{-/-} patients (**p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 using comparison with chi square test and Yates correction for continuity when appropriate)

Mutations in *CYC1*, Encoding Cytochrome c_1 Subunit of Respiratory Chain Complex III, Cause Insulin-Responsive Hyperglycemia

Pauline Gaignard,^{1,21} Minal Menezes,^{2,21} Manuel Schiff,^{3,4,5} Aurélien Bayot,^{3,4} Malgorzata Rak,^{3,4} Hélène Ogier de Baulny,⁵ Chen-Hsien Su,⁶ Mylene Gilleron,^{7,8} Anne Lombes,^{7,8} Heni Abida,⁶ Alexander Tzagoloff,⁶ Lisa Riley,⁹ Sandra T. Cooper,^{2,10} Kym Mina,^{11,12} Padma Sivadorai,¹³ Mark R. Davis,¹³ Richard J.N. Allcock,^{14,15} Nina Kresoje,¹⁴ Nigel G. Laing,^{16,17} David R. Thorburn,^{18,19} Abdelhamid Slama,¹ John Christodoulou,^{2,9,20} and Pierre Rustin^{3,4,*}

Many individuals with abnormalities of mitochondrial respiratory chain complex III remain genetically undefined. Here, we report mutations (c.288G>T [p.Trp96Cys] and c.643C>T [p.Leu215Phe]) in *CYC1*, encoding the cytochrome c_1 subunit of complex III, in two unrelated children presenting with recurrent episodes of ketoacidosis and insulin-responsive hyperglycemia. Cytochrome c_1 , the heme-containing component of complex III, mediates the transfer of electrons from the Rieske iron-sulfur protein to cytochrome c . Cytochrome c_1 is present at reduced levels in the skeletal muscle and skin fibroblasts of affected individuals. Moreover, studies on yeast mutants and affected individuals' fibroblasts have shown that exogenous expression of wild-type *CYC1* rescues complex III activity, demonstrating the deleterious effect of each mutation on cytochrome c_1 stability and complex III activity.

Complex III (CIII) of the mitochondrial respiratory chain contains 11 subunits, one of which (cytochrome b) is encoded by mitochondrial DNA. CIII conveys electrons from ubiquinol to cytochrome c . It associates with complexes I (CI) and IV (CIV) to form the respirasome.¹ Cytochrome c_1 (Cyt c_1), cytochrome b , and the Rieske protein are the three CIII redox components. The heme moiety of Cyt c_1 is in the N-terminal domain, located in the intermembrane space, where it accepts electrons from the Rieske protein. Cyt c_1 is anchored to the phospholipid bilayer by a single C-proximal transmembrane segment.²

Primary CIII deficiencies, although infrequent, have strikingly different clinical presentations. Mutations in mitochondrial *CYTB* or in the nuclear genes encoding CIII subunits or assembly factors elicit a wide range of tissue-specific defects in affected individuals; they include encephalopathy with renal involvement or lethal infantile hepatic failure (from *BCS1L* [MIM 124000] mutations in GRACILE syndrome [MIM 603358]);^{3,4} severe psychomo-

tor retardation and extrapyramidal signs, dystonia, athetosis, and ataxia (from *UQCRQ* [MIM 615159] mutations);⁵ mitochondrial encephalopathy (from *BCS1L*, *TTC19* [MIM 613814], *CYTB* [MIM 516020] mutations);⁶ pili torti and sensorineural hearing loss, known as Björnstad syndrome (from *BCS1L* mutations);⁷ optic neuropathy, exercise intolerance, and/or cardiomyopathy (from *CYTB* mutations);⁸ and transient episodes of hypoglycemia and lactic acidosis (from *UQCRB* [MIM 191330] and *UQCRC2* [MIM 191329] mutations).^{9,10}

We first carried out respiratory chain (RC) enzyme analysis of muscle, liver, and fibroblasts of two children (from unrelated consanguineous families) presenting with unexplained ketoacidosis and recurrent hyperlactacidemia. All investigations were carried out according to the recommendations of the relevant local ethical committees and with the informed consent of affected individuals and/or their families. The study revealed an isolated CIII deficiency in the two children (Table S1, available online).

¹Laboratoire de Biochimie, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 78 Rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre Cedex, France;

²Discipline of Paediatrics, Sydney Medical School, University of Sydney, Camperdown NSW 2006, Australia; ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche 676, Hôpital Robert Debré, 48 Boulevard Sérurier, 75019 Paris, France; ⁴Faculté de Médecine Denis Diderot, Université Paris Diderot – Paris 7, Site Robert Debré, 48 Boulevard Sérurier, 75019 Paris, France; ⁵Reference Center for Inherited Metabolic Diseases, Hôpital Robert Debré, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 48 Boulevard Sérurier, 75019 Paris, France; ⁶Department of Biological Sciences, Columbia University, New York, NY 10027, USA; ⁷Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche 1016, Institut Cochin, 75014 Paris, France; ⁸Service de Biochimie Métabolique et Centre de Génétique Moléculaire et Chromosomique, Hôpital de La Salpêtrière, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 75651 Paris, France; ⁹Genetic Metabolic Disorders Research Unit, Kids Research Institute, Children's Hospital at Westmead, Sydney, Westmead NSW 2145, Australia; ¹⁰Institute for Neuroscience and Muscle Research, Children's Hospital at Westmead, Sydney, Westmead NSW 2145, Australia;

¹¹Department of Molecular Genetics, PathWest Laboratory Medicine WA, Royal Perth Hospital, Perth, WA 6000, Australia; ¹²School of Pathology and Laboratory Medicine, The University of Western Australia, Nedlands, WA 6009, Australia; ¹³Neurogenetic Laboratory, Department of Anatomical Pathology, PathWest Laboratory Medicine WA, Royal Perth Hospital, Perth, WA 6000, Australia; ¹⁴Lotterywest State Biomedical Facility Genomics and School of Pathology and Laboratory Medicine, University of Western Australia, Nedlands, WA 6009, Australia; ¹⁵Department of Clinical Immunology, PathWest Laboratory Medicine WA, Royal Perth Hospital, Perth, WA 6000, Australia; ¹⁶Centre for Medical Research, University of Western Australia, Nedlands, WA 6009, Australia; ¹⁷Western Australian Institute for Medical Research, Queen Elizabeth II Medical Centre, Nedlands, WA 6009, Australia; ¹⁸Victorian Clinical Genetics Services, Murdoch Childrens Research Institute and Royal Children's Hospital, Flemington Road, Parkville, Melbourne, VIC 3052, Australia; ¹⁹Department of Paediatrics, University of Melbourne, Melbourne, VIC 3010, Australia; ²⁰Child Health and Genetic Medicine, Sydney Medical School, University of Sydney, Camperdown, NSW 2006, Australia

²¹These authors contributed equally to this work

*Correspondence: pierre.rustin@inserm.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.06.015>. ©2013 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

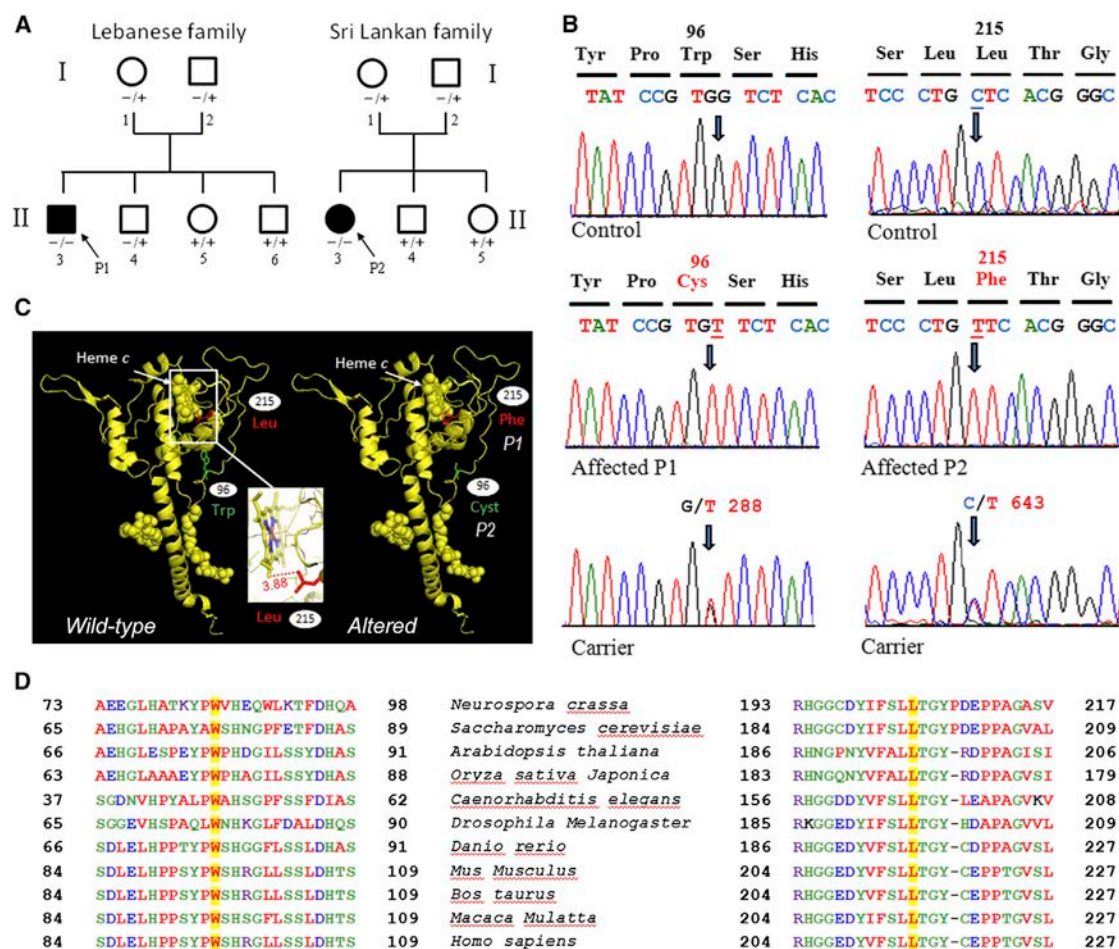


Figure 1. Gene Analysis in Families Affected by *CYC1* Mutations

(A) Pedigrees of the Lebanese (with P1) and Sri Lankan (with P2) families. Affected individuals (dark symbols) harbor homozygous (–/–) mutations. Unaffected individuals are either heterozygous (–/+) or wild-type (+/+).

(B) Analysis of *CYC1* genomic DNA. For P1, a single candidate disease-causing homozygous missense variant in *CYC1* was identified by exome sequencing. For P2, who has defective CIII activity, a candidate-gene strategy resulted in sequencing cDNA obtained from total RNA of cultured fibroblasts and revealed a missense mutation (c.643C>T) in *CYC1*.

(C and D) Cyt *c*₁ structures (C) and alignment (D).

The first child (P1; II-3, Lebanese family in Figure 1) is the son of first-cousin parents of Lebanese background. An older brother has autism and intellectual disability, and an older sister and a younger brother exhibit normal growth and development. The proband was born at 36 weeks of gestation (Table S2) after a pregnancy complicated by gestational diabetes, for which his mother needed insulin therapy. His birth weight was 2,300 g (10–50th percentile), his length was 46 cm (10–50th percentile), and his head circumference was 32 cm (50–90th percentile). He had normal early development. He first presented at 5 months of age with severe metabolic ketoacidosis (pH 7.04) after a 24 hr history of a febrile illness causing vomiting (Table S1). His initial blood lactate was 13 mmol/l (normal range = 0.7–2.0 mmol/l), and he also had hyperammonemia (260 μmol/l; normal range = 10–50 μmol/l). He was treated with fluid resuscitation, sodium benzoate, and arginine, and over the next few days his biochemistry corrected. He went on to have recurrent

episodes of fulminant lactic acidemia with intercurrent illnesses; his lactate-to-pyruvate ratio was as high as 66, and his blood glucose was labile (it fluctuated from 3 to 30 mmol/l) and required insulin therapy. This prompted us to investigate RC enzyme in muscle, liver, and skin biopsies, which revealed a severe and consistent isolated CIII defect (the ratio of CIII to citrate synthase activity was 4%, 24%, and 25% of the mean control values in liver, muscle, and skin fibroblasts, respectively) (Table S1). At 34 months of age, he was exhibiting normal development and was assessed to have normal cardiac, ophthalmological, and audiological functions. His weight was 11.2 kg (first percentile), and his length was 86.5 cm (first percentile). His head circumference 6 months earlier was 48.0 cm (23rd percentile).

The second affected child (P2; II-3, Sri Lankan family in Figure 1) is a girl (third child) born to first-cousin parents of Sri Lankan background. After an uneventful pregnancy and delivery, she presented with mild growth retardation

and congenital left ptosis. She was admitted at 2.5 years of age for acute vomiting with dehydration and progressive neurological deterioration, which led to a coma. A biological workup (Table S2) revealed hyperglycemic ketoacidosis with hyperlactatemia, liver failure, and hyperammonemia. The clinical condition rapidly improved with intravenous rehydration and insulin. During the following years, she exhibited normal psychomotor development, moderate failure to thrive, and numerous episodes of acute decompensation with ketoacidosis, hypoglycemia or hyperglycemia, and liver failure with hyperammonemia usually triggered by minor infections. A metabolic workup performed when the child was not decompensated disclosed mild permanent hyperlactacidemia (10 mmol/l; normal range = 1.0–3.75 mmol/l) with an increased lactate-to-pyruvate ratio (27 μ mol/l; normal = 10–17 μ mol/l), suggestive of a RC disorder. CIII deficiency was detected in muscle and was confirmed in cultured fibroblasts (Table S1). At the last follow-up examination, P2 was 18 years of age and had normal development and schooling. She still presents with rare episodes of metabolic decompensation with lactic acidosis.

For P1, who has isolated CIII deficiency, *BCS1L*, *UQCRB*, *TTC19* (genes previously associated with CIII defects), and *UQCR10* (MIM 610843; encoding a subunit of CIII) were sequenced, but no pathogenic mutations were identified. Whole-exome sequencing was subsequently performed. A library was first obtained from DNA (3 μ g) fragmentation by sonication and ligation to SOLiDTM system sequencing adaptors and was next enriched for exomic sequences with the SeqCap EZ Human Exome Library v.2.0 exome-capture system (Nimblegen, Roche Diagnostics). After sequencing and alignment, >80% of the exome was covered at a depth of 20-fold or greater (average depth = 152-fold). Calling of single-nucleotide variants (SNVs) and indels was performed with LifeScope 2.5 (Life Technologies), and the resulting variant calls (>25,000 SNVs and >3,500 indels) were filtered with ANNOVAR 11 with in-house modifications. Genes were annotated with ENCODE Gencode v.11 (October 2011 freeze, GRCh37). Variants were first filtered against the 1000 Genomes database (2012 February release), whereby variants with a minor allele frequency greater than 0.5% were filtered out. Second, remaining variants were filtered against the dbSNP135 common database. The remaining variants were matched to a list of nuclear mitochondrial genes, and in silico prediction using Alamut v.2 (Interactive Biosoftware) identified variants of potential interest in 21 mitochondrial genes. Variants were filtered on the basis of recessive inheritance and a predicted role in CIII deficiency. A single candidate disease-causing homozygous missense variant in *CYC1* (RefSeq accession number NM_001916.3) was identified: c.288G>T (p.Trp96Cys) (Figure 1). Bidirectional Sanger sequencing confirmed the variant in this individual and demonstrated segregation of the variant within the family (Figure 1). The mutation was absent in 81 unrelated Lebanese controls.

For the Sri Lankan girl (P2), who has low CIII activity in muscle and fibroblasts, the 11 genes coding for CIII subunits were sequenced (ABI Prism 3130XL; Applied Biosystems). DNA was extracted according to standard procedure, and mitochondrial DNA was examined by long-range PCR. Sequence analysis of *CYTB* and *BCS1L* was performed on gDNA. Sequence analysis of the nine nuclear genes (*CYC1*, *UQCRFS1* [MIM 191327], *UQCRC1* [MIM 191328], *UQCRC2*, *UQCRH* [MIM 613844], *UQCRB*, *UQCR10*, *UQCRQ*, and *UQCR* [MIM 609711]) encoding CIII subunits was performed on cDNA obtained from total RNA of cultured fibroblasts. A missense mutation (c.643C>T) resulting in a nonconservative substitution (p.Leu215Phe) within a highly conserved region of Cyt c_1 was detected in *CYC1* (Figure 1). This mutation was found to be heterozygous in each of her clinically unaffected parents and absent from her two unaffected siblings. This mutation is absent from dbSNP, 1000 Genomes databases, and 100 sequenced control alleles.

Immunoblot analysis of fibroblasts and skeletal-muscle samples from P1 and P2 showed a severe reduction in Cyt c_1 levels (<10% of control levels), suggesting that the mutations make the Cyt c_1 protein highly unstable (Figures 2A–2C and Figure S1). The reduction of Cyt c_1 levels was accompanied by markedly reduced levels of assembly-dependent CIII subunits (core 2), especially in the muscle (Figures 2A and 2B). The severe depletion of Cyt c_1 , core 2 (P1), and core 1 (P2) subunits accounts for the loss of activity of the complex, which could hardly be assembled in the absence of these subunits. For P1, reduced levels of assembly-dependent subunits of CI (subunit NDUF8) was also observed in fibroblasts only (Figure 2A), suggesting that *CYC1* mutations might also affect the in vivo stability or assembly of other RC components. Accordingly, in P2 fibroblasts, the severe reduction of Cyt c_1 and core 1 was accompanied by the absence of RC supercomplexes (Figure 2C).

To confirm that the two *CYC1* mutations were responsible for the observed clinical and biochemical phenotypes, we examined the effect of the mutations on mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*. The human mutations were engineered at orthologous positions c.228G>T (p.Leu195Phe) and c.585G>T (p.Trp76Cys) within the yeast gene (*y-CYC1*). The wild-type and mutant genes were either introduced in multiple copies on an episomal plasmid or integrated into the chromosomal DNA at the URA3 locus of a respiratory-deficient haploid strain carrying a null mutation in *y-CYC1* ($\Delta y-cyc1$). Transformants confirmed to have a single copy of the mutant genes failed to grow on nonfermentable carbon sources (Figure 2D). In contrast, the growth defect of the $\Delta y-cyc1$ mutant was rescued in transformants harboring multiple copies of the mutant genes. As expected, the wild-type gene (either in single copy or multiple copies) restored wild-type growth on the respiratory substrates. The CIII-dependent activities of mitochondria from the different transformants were consistent with

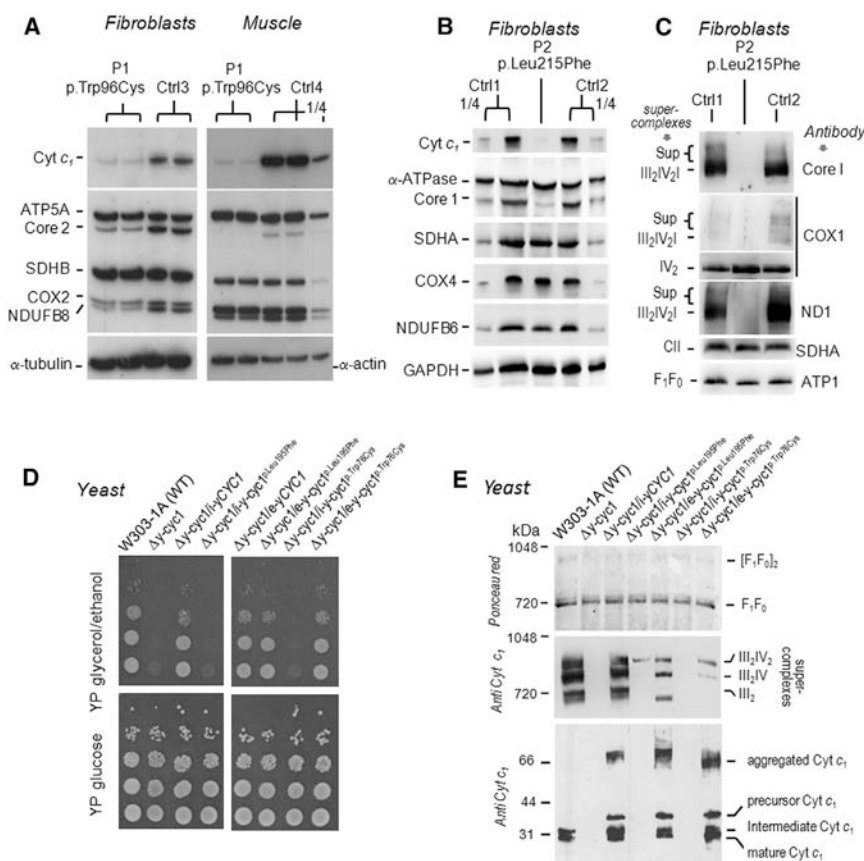


Figure 2. Analysis of Cyt *c*₁ Mutant Cells and Rescue in Yeast Cells

(A–C) Immunoblots of affected individuals' (P1 [with Cyt *c*₁ p.Trp96Cys] and P2 [with Cyt *c*₁ p.Leu215Phe]) RCs under denaturing (A and B) or native (C) conditions.

(A and B) Immunoblot of the levels of Cyt *c*₁ oxidative-phosphorylation subunits in fibroblasts and skeletal muscle (A and B). Compared to those of the controls (Ctrl1–Ctrl4), levels of Cyt *c*₁ and CIII were severely reduced in affected individual fibroblasts and skeletal muscle. Secondary reductions of assembly-dependent subunits of CI and CIV were also observed. SDS-PAGE and immunoblot were carried out on whole-cell lysate from fibroblasts (20 μg) or skeletal-muscle homogenate (5 μg). "1/4" indicates that 1/4 of the sample was loaded.

(C) Protein extract from fibroblasts (6% digitonin; 50 μg) was separated by blue-native PAGE on a 3.5%–12% polyacrylamide gel. Proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane and probed with a set of antibodies as indicated in the figure. The various super-complexes and complexes and the ATP synthase (F₁F₀) are identified in the margins.

(D) Growth of wild-type and mutant yeast. Serial dilutions of the parental W303-1A strain, the Δ*y-cyc1* null mutant, and the null mutant harboring the wild-type (Δ*y-cyc1*/i-*y-cyc1*) or mutant genes in a single

copy by integration at the *URA3* locus (Δ*y-cyc1*/i-*y-cyc1*) or in multiple copies in an episomal plasmid (Δ*y-cyc1*/e-*y-cyc1*) were serially diluted and spotted on plates supplemented with glucose or glycerol plus ethanol and incubated at 30°C for 2 days.

(E) Immunoblot analysis of yeast Cyt *c*₁. In the upper two panels, mitochondrial extracts (3% digitonin; 250 μg protein) were separated by blue-native PAGE on a 4%–13% polyacrylamide gel. Proteins were transferred to a PVDF membrane and stained with Ponceau red before being probed with a polyclonal antibody against yeast Cyt *c*₁. The various super-complexes and complexes and the ATP synthase (F₁F₀) are identified in the margins. In the lower panel, mitochondrial proteins (37 μg) were separated by SDS-PAGE on a 15% polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose and probed with a polyclonal antibody against yeast Cyt *c*₁.

their growth phenotypes. Transformants with a single copy of the mutant genes had only 7% of the activity measured in the wild-type integrant (Table S3). The NADH cytochrome *c* reductase activity of CI and CIII increased to 52% and 33%, respectively, of that of the wild-type when the mutant genes were introduced on a multicopy plasmid.

Immunoblot analysis of yeast mitochondria revealed a near-complete absence of Cyt *c*₁ and CIII in mutants with single copies of the p.Leu195Phe or p.Trp76Cys proteins (Figure 2E), consistent with results in affected individuals' fibroblasts and muscles (Figures 2A–2C). Even though the levels of Cyt *c*₁ in mutants overexpressing the genes were similar or even higher than those in the wild-type, immunohistochemically detectable CIII (as the dimer or as part of super-complexes) was significantly reduced and correlated with their NADH cytochrome *c* reductase activities (Figure 2E and Table S3). Overexpression of the wild-type or mutant yeast gene led to some aggregation of Cyt *c*₁, which was not completely dissociated in the sample buffer. Some overexpression of Cyt *c*₁ was also evident in the strain with an integrated copy of the wild-type gene,

resulting in aggregation as well. Presumably, when integrated at the *URA3* locus, the mutant genes are also expressed above wild-type levels but are readily degraded as a result of their reduced stability. When expressed from a multicopy plasmid, however, the turnover rate is insufficient to clear all of the aggregated Cyt *c*₁.

Data obtained with the recombinant lentiviral constructs containing either wild-type or mutant *CYC1* cDNA of affected individual fibroblasts mimicked the results obtained with yeast. Moderate overexpression of wild-type, but not mutant, *CYC1* (obtained with the use of a standard number of virus particles; multiplicity of infection [MOI] = 5) in the context of the endogenous c.643C>T mutant gene led to a partial rescue of CIII (see P2 in Figures S2A and S2B). Increased expression of *CYC1* achieved with virus-particle levels of MOI = 120 allowed even mutant *CYC1* to partially rescue CIII (see P1 in Figure S2C and S2D).

Together, the data obtained with cultured fibroblasts and yeast establish the deleterious effect of two *CYC1* mutations for CIII assembly or stability in two individuals of different ethnic backgrounds; these mutations lead to

quite a similar clinical presentation of ketoacidosis and lactic acidosis associated with insulin responsive hyperglycemia but with normal cognition. The mutations resulted in reduced levels of Cyt c_1 and CIII and appeared to primarily affect the tertiary structure of Cyt c_1 and thus render it more susceptible to proteolysis or alternatively less efficient to assembly with its partner subunits. Both circumstances would explain the low steady-state concentration of altered Cyt c_1 in the single-copy yeast integrants and the partial rescue of CIII assembly when the genes are expressed from a multicopy plasmid. Analysis of the Cyt c_1 crystal structure¹¹ suggests that conformational changes due to the amino acid substitutions (Figure 1C) are most likely to occur in the extramembrane domain, whose function, though not clearly understood, plays a role in maintaining the structural and functional integrity of CIII.² The tertiary-structure change might be a collapse of the long random coil containing the inward-facing tryptophan when the latter is replaced by the smaller cysteine or when a bulkier phenylalanine is substituted for the leucine, which is only 3.9Å away from a methyl group of the heme moiety. Unexpectedly, the redox activity of the altered proteins was retained in the transformants harboring multiple copies of the gene (Table S3). This was particularly surprising in the case of the p.Leu195Phe substitution (modeling the human p.Leu215Phe substitution), which is expected to alter the heme environment. These data suggest that the substitutions primarily affect the structural integrity of Cyt c_1 and thereby reduce its concentration and its likelihood to assemble with other CIII subunits. The assembly defect can be compensated for by an increase in the pool of available altered Cyt c_1 , either in the yeast transformants harboring multiple copies of the gene or in fibroblasts with a high MOI. Under these conditions, the resultant CIII appears to be fully active in transferring electrons to cytochrome c .

It is interesting to note that even though the RC assays (Table S2) showed affected individuals to have mainly an isolated CIII deficiency, the immunoblot data for fibroblasts revealed a severe reduction of supercomplexes. Similarly, in the yeast complementation studies, there were reduced levels of CIII dimers and supercomplexes. Previous studies have suggested that it is essential to have a fully assembled CIII for the stability and activity of CI¹² and that together, CI and CIII form a stable core respirasome to which CIV can also bind.¹ These data collectively suggest that the *CYC1* mutations affect the stability or assembly of the respirasome, most likely as a result of decreased CIII levels stemming from the depletion in Cyt c_1 , core 1, and core 2 subunits.

CIII deficiencies have highly variable clinical presentations, although they have common defects in insulin-signaling mechanisms and lactic acidosis (for example, *UQCRB* and *UQCR2*^{9,10}). Mitochondrial oxidative activity due to RC deficits can be considered one of the key determinants underlying hyperglycemia.¹³ Studies have suggested that CIII is one of the major sources of reactive

oxygen species (ROS).¹⁴ Given that ROS has been shown to affect insulin signaling and action, this could explain the hyperglycemia phenotype in the affected individuals.¹⁵

In conclusion, our studies show that two different *CYC1* mutations cause ketoacidotic and lactic acidotic encephalopathy and insulin-responsive hyperglycemia. This clinical phenotype is the result of severe reductions in cytochrome c_1 , as well as marked reductions in other assembly-dependent CIII subunits. Rescue experiments confirm the *CYC1* mutations to be the primary cause of CIII defects. The similarity of the clinical symptoms in the two affected individuals leads us to recommend mutation screening for *CYC1* in young children presenting with recurrent lactic acidosis and hyperglycemia.

Supplemental Data

Supplemental Data include two figures and three tables and can be found with this article at <http://www.cell.com/AJHG>.

Acknowledgments

We thank Alison Compton and Justine Marum for Sequenom analysis and Wendy Salter for enzyme assays. This research was supported by Association contre les Maladies Mitochondriales, Action Rémy (A.S. and P.R.), Agence Nationale de la Recherche grants to P.R., National Institutes of Health grant HL02274 to A.T., Australian National Health and Medical Research Council (NHMRC) grant 1026891 to S.C. and J.C., an Australian Mitochondrial Disease Foundation (AMDF) PhD Scholarship to M.M., and AMDF funding support to M.D. and N.G.L. N.G.L. was supported by NHMRC Principal Research Fellowship 1002147 and project grant 1022707. D.R.T. was supported by NHMRC Principal Research Fellowship 1022896 and project grant 1023619. We also gratefully acknowledge donations to J.C. by the Crane and Perkins families.

Received: February 27, 2013

Revised: March 11, 2013

Accepted: June 17, 2013

Published: August 1, 2013

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://omim.org/>
RefSeq, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>

References

- Schägger, H., de Co, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C., and Brandt, U. (2004). Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 279, 36349–36353.
- Hunte, C., Palsdottir, H., and Trumpower, B.L. (2003). Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex. *FEBS Lett.* 545, 39–46.
- de Lonlay, P., Valnot, I., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Tzagoloff, A., Taanman, J.W., Benayoun, E., Chrétien, D., Kadhon, N., Lombès, A., et al. (2001). A mutant mitochondrial

- respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat. Genet.* 29, 57–60.
4. Visapää, I., Fellman, V., Vesa, J., Dasvarma, A., Hutton, J.L., Kumar, V., Payne, G.S., Makarow, M., Van Coster, R., Taylor, R.W., et al. (2002). GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 863–876.
 5. Barel, O., Shorer, Z., Flusser, H., Ofir, R., Narkis, G., Finer, G., Shalev, H., Nasasra, A., Saada, A., and Birk, O.S. (2008). Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 1211–1216.
 6. Ghezzi, D., Arzuffi, P., Zordan, M., Da Re, C., Lamperti, C., Benna, C., D'Adamo, P., Diodato, D., Costa, R., Mariotti, C., et al. (2011). Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Nat. Genet.* 43, 259–263.
 7. Hinson, J.T., Fantin, V.R., Schönberger, J., Breivik, N., Siem, G., McDonough, B., Sharma, P., Keogh, I., Godinho, R., Santos, F., et al. (2007). Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Björnstad syndrome. *N. Engl. J. Med.* 356, 809–819.
 8. Munnich, A., and Rustin, P. (2001). Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders. *Am. J. Med. Genet.* 106, 4–17.
 9. Haut, S., Brivet, M., Touati, G., Rustin, P., Lebon, S., Garcia-Cazorla, A., Saudubray, J.M., Boutron, A., Legrand, A., and Slama, A. (2003). A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Hum. Genet.* 113, 118–122.
 10. Miyake, N., Yano, S., Sakai, C., Hatakeyama, H., Matsushima, Y., Shiina, M., Watanabe, Y., Bartley, J., Abdenur, J.E., Wang, R.Y., et al. (2013). Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous UQCRC2 mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. *Hum. Mutat.* 34, 446–452.
 11. Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., and Jap, B.K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science* 281, 64–71.
 12. Acín-Pérez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernández-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T., and Enríquez, J.A. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol. Cell* 13, 805–815.
 13. Patti, M.E., and Corvera, S. (2010). The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 31, 364–395.
 14. Diaz, F., Garcia, S., Padgett, K.R., and Moraes, C.T. (2012). A defect in the mitochondrial complex III, but not complex IV, triggers early ROS-dependent damage in defined brain regions. *Hum. Mol. Genet.* 21, 5066–5077.
 15. Loh, K., Deng, H., Fukushima, A., Cai, X., Boivin, B., Galic, S., Bruce, C., Shields, B.J., Skiba, B., Ooms, L.M., et al. (2009). Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab.* 10, 260–272.